Principais temas da pesquisa em

CIÊNCIAS BIOLÓGICAS 3

Alana Maria Cerqueira de Oliveira
(Organizadora)

Atena Editora
Ano 2023

Principais temas da pesquisa em

CIÊNCIAS BIOLÓGICAS 3

Alana Maria Cerqueira de Oliveira
(Organizadora)

Atena
Editora
Ano 2023

Editora chefe
Profª Drª Antonella Carvalho de Oliveira
Editora executiva
Natalia Oliveira
Assistente editorial
Flávia Roberta Barão
Bibliotecária
Janaina Ramos
Projeto gráfico
Camila Alves de Cremo
Ellen Andressa Kubisty
Luiza Alves Batista
Nataly Evilin Gayde
Imagens da capa
iStock
Edição de arte
Luiza Alves Batista

CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE

CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE

Principais temas da pesquisa em ciências biológicas 3

Diagramação: Luiza Alves Batista
Correção: Soellen de Britto
Indexação: Amanda Kelly da Costa Veiga
Revisão: Os autores
Organizadora: Alana Maria Cerqueira de Oliveira

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

P957 Principais temas da pesquisa em ciências biológicas 3 / Organizadora Alana Maria Cerqueira de Oliveira. – Ponta Grossa - PR: Atena, 2023.

Formato: PDF
Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader
Modo de acesso: World Wide Web
Inclui bibliografia
ISBN 978-65-258-1513-8
DOI: https://doi.org/10.22533/at.ed.138232707

1. Ciências biológicas. I. Oliveira, Alana Maria Cerqueira de (Organizadora). II. Título.

CDD 570

Elaborado por Bibliotecária Janaina Ramos – CRB-8/9166

Atena Editora
Ponta Grossa – Paraná – Brasil
Telefone: +55 (42) 3323-5493
www.atenaeditora.com.br
contato@atenaeditora.com.br

DECLARAÇÃO DOS AUTORES

Os autores desta obra: 1. Atestam não possuir qualquer interesse comercial que constitua um conflito de interesses em relação ao artigo científico publicado; 2. Declaram que participaram ativamente da construção dos respectivos manuscritos, preferencialmente na: a) Concepção do estudo, e/ou aquisição de dados, e/ou análise e interpretação de dados; b) Elaboração do artigo ou revisão com vistas a tornar o material intelectualmente relevante; c) Aprovação final do manuscrito para submissão.; 3. Certificam que os artigos científicos publicados estão completamente isentos de dados e/ou resultados fraudulentos; 4. Confirmam a citação e a referência correta de todos os dados e de interpretações de dados de outras pesquisas; 5. Reconhecem terem informado todas as fontes de financiamento recebidas para a consecução da pesquisa; 6. Autorizam a edição da obra, que incluem os registros de ficha catalográfica, ISBN, DOI e demais indexadores, projeto visual e criação de capa, diagramação de miolo, assim como lançamento e divulgação da mesma conforme critérios da Atena Editora.

DECLARAÇÃO DA EDITORA

APRESENTAÇÃO

A Obra "Principais temas da pesquisa em Ciências Biológicas 3" publicada no formato e-book, traz ao leitor nove artigos que abordam diferentes perspectivas de relevada importância na área de Ciências Biológicas.

É indubitavelmente evidente o avanço científico nesta área, o que aumenta a importância e a necessidade de atualização e consolidação de conceitos, técnicas, procedimentos e temas. As Ciências Biológicas é uma vasta área de estudo e de alta complexidade que abrange o estudo dos seres vivos e suas relações, bem como sua interação com o meio ambiente. É uma ciência que interage e serve de base para diversas áreas do conhecimento como educação, biotecnologia, Biologia molecular, parasitologia, saúde, ecologia, entre outras.

As investigações científicas, são publicadas na forma de artigos originais e resenhas que abrangem diferentes campos dentro da área de Ciências Biológicas e suas conexões.

O foco principal deste trabalho é discutir a produção de conhecimento, a atualização sobre o tipo de pesquisa que é realizada atualmente na área, a discussão científica e a divulgação de pesquisas nacional, abrangendo diferentes áreas afins.

O trabalho foi pensado principalmente com foco em profissionais, pesquisadores e estudantes da área de Ciências Biológicas e suas interfaces ou áreas afins. No entanto, é uma leitura interessante para todos aqueles que de alguma forma se interessam pela área.

Cada capítulo foi elaborado com o objetivo de transmitir a informação científica de forma clara e eficaz, acessível, concisa e didática, em português, atraindo a atenção do leitor, independentemente de seu interesse ser acadêmico ou profissional.

Os capítulos estão distribuídos em temáticas que abordam de forma categorizada e multidisciplinar a Ciências biológicas, as pesquisas englobam estudos de: predição de small nucleolar host gene (SNHG), fatores de virulência, base genética para a obesidade, inibidores de proteinases vegetais, Odonata parasitadas, vírus da hepatite C (HCV), celulose bacteriana e quitosana, técnicas de encapsulamento e feiras de ciências.

O livro "Principais temas da pesquisa em Ciências Biológicas 3" traz publicações atuais e a Atena Editora traz uma plataforma que oferece uma estrutura adequada, propícia e confiável para a divulgação científica de diversas áreas de pesquisa.

Uma ótima leitura para todos!

Alana Maria Cerqueira de Oliveira

PREDIÇÃO DE SMALL NUCLEOLAR HOST GENE (SNHG): UMA ANÁLISE *IN SILICO*

Data de submissão: 10/05/2023
Data de aceite: 03/07/2023

Thaís Da Conceição Silva
Universidade Estadual do Maranhão, Brasil (UEMA)
Zé Doca - Maranhão
http://lattes.cnpq.br/9979829834124140

Ana Gabrielly de Melo Matos
Universidade Estadual do Maranhão (UEMA)
Bacabal - Maranhão
http://lattes.cnpq.br/1409134844631350

Larissa Rodrigues de Sousa
Universidade Estadual do Maranhão (UEMA)
Zé Doca - Maranhão
http://lattes.cnpq.br/5592182089146389

Eldevan da Silva Barbosa
Universidade Estadual do Maranhão (UEMA)
Zé Doca - Maranhão
http://lattes.cnpq.br/8385390184626184

Emanoel Da Luz Silva Sousa
Universidade Estadual do Maranhão (UEMA)
Zé Doca - Maranhão
http://lattes.cnpq.br/4565170398249432

Maiza de Souza Palmeira
Universidade Estadual do Maranhão (UEMA)
Zé Doca - Maranhão
http://lattes.cnpq.br/8887251842273290

Alania Frank Mendonça
Universidade Estadual do Maranhão (UEMA).
Zé Doca - Maranhão
http://lattes.cnpq.br/3865263332119363

Eliel Barbosa Teixeira
Programa de Pós-graduação em Biotecnologia (PPGBIOTEC/UFPA)
Belém - Pará
http://lattes.cnpq.br/7240638804398730

Susanne Suely Santos da Fonseca
Núcleo de Pesquisa em Oncologia (NPO/UFPA)
Belém - Pará
http://lattes.cnpq.br/2110854615569601

Antonia Claudia da Conceição Palmeira
Universidade Estadual do Maranhão (UEMA)
Zé Doca - Maranhão
http://lattes.cnpq.br/8834474096531833

Igor da Cruz Pinheiro
Universidade Estadual do Maranhão
Zé Doca - Maranhão
http://lattes.cnpq.br/4490404465182283

Jaqueline Diniz Pinho
Universidade Estadual do Maranhão (UEMA)
Zé Doca - Maranhão
http://lattes.cnpq.br/6694295336757147

RESUMO: Os genes hospedeiros de RNA nucleolar pequeno (SNHGs) desempenham diversas atividades e mecanismo de ação em vários tipos de câncer promovendo proliferação, apoptose, invasão e migração. Neste contexto, buscou-se fazer uma caracterização dos SNHGs (Host Gene de snoRNAs) por meio de dados provenientes de databases públicos e on-line a fim de predizer o papel destas biomoléculas no câncer. Para a obtenção dos dados foram feitas buscas dos SNHGs por meio da caracterização dos snoRNAs, utilizando as ferramentas RNA central, SnoDB esnoRNA Atlas. Foi possível observar 58 snoRNAs através do RNA central, sendo 51 C/D Box, 6 H/ ACA Box e 1 small Cajal Body. Quanto à expressão dos SNHGs, foram feitas buscas com carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço e câncer cervical. Além disso, foi feita a busca de microRNAs regulados por essas biomoléculas. Foi possível observar que o SNHG1 apresenta maior nível de expressão quando comparado com o tumor e amostra normal, enquanto o menor é o SNHG3 em câncer de cabeça e pescoço, já em câncer cervical, o SNHG3 apresentou maior expressão e o SNHG22 menor expressão. Através da função dos SNHGs foi possível observar que estas biomoléculas interagem com microRNAs. Mediante aos resultados obtidos foi possível observar que a caracterização *in silico* destas biomoléculas trouxe informações sobre a função, e potencialidade como biomarcadores de prognóstico.
PALAVRAS-CHAVE: Biomarcadores, Oncogênese, LncRNAs, microRNAs, snoRNAs.

SMALL NUCLEOLAR HOST GENE (SNHG) PREDICTION: AN *IN SILICO ANALYSIS*

ABSTRACT: Host small nucleolar RNA genes (SNHGs) play diverse activities and mechanism of action in several types of cancer promoting proliferation, apoptosis, invasion and migration. In this context, we sought to characterize SNHGs (Host Gene of snoRNAs) using data from public and online databases in order to predict the role of these biomolecules in cancer. To obtain the data, SNHGs were searched by snoRNAs characterization using RNA central, SnoDB and snoRNA Atlas tools. It was possible to observe 58 snoRNAs through RNA central, being 51 C/D Box, 6 H/ ACA Box and 1 small Cajal Body. As for the expression of SNHGs, searches were performed with head and neck squamous cell carcinoma and cervical cancer. In addition, a search for microRNAs regulated by these biomolecules was performed. It was possible to observe that SNHG1 shows higher expression level when compared with tumor and normal sample, while the lowest is SNHG3 in head and neck cancer, already in cervical

cancer, SNHG3 showed higher expression and SNHG22 lower expression. Through the function of SNHGs it was possible to observe that these biomolecules interact with microRNAs. Through the obtained results it was possible to observe that the in silico characterization of these biomolecules brought information about the function, and potentiality as prognostic biomarkers.
KEYWORDS: Biomarkers, Oncogenesis, LncRNAs, microRNAs, snoRNAs.

1 I INTRODUÇÃO

O câncer é um processo multifatorial desencadeado por mecanismos genéticos e epigenéticos, associados ou não a fatores ambientais, que resultam na proliferação e transformação de células normais em células cancerosas. (HRISTOVA; CHAN, 2019). As células tumorais podem apresentar instabilidade genômica, danos no DNA, alterações em genes específicos do ciclo celular, dentre outras mudanças, que conferem vantagens ao tumor. como: proliferação, estresse, vascularização, invasão e metástase, reprogramação do metabolismo energético, evasão da vigilância imune, microambiente insatisfatório e mecanismo epigenético (FOUAD & AANEI, 2017).

A epigenética é oconjunto de modificações que ocorrem no fenótipo, precisamente na função do gene e que não interfere na sequência de bases do DNA, podendo ser herdados (FANTAPPIÉ, 2013). Dentre as alterações epigenéticas implicadas no câncer estão a metilação do DNA, as modificações de histonas e os RNAs não codificantes, mecanismos estes importantes para a regulação epigenética (OLIVEIRA et al., 2010).

Embora negligenciados no passado, os RNAs não codificantes (ncRNAs) desempenham um papel crucial na regulação gênica, fato este representado pela sua abundância no genoma dos seres multicelulares (LINS, 2018). Os ncRNAs são classificados em famílias, segundo sua estrutura, da mesma forma que os genes codificantes. A desregulação dos lncRNAs já foi relatada em neoplasias malignas, tais como câncer de mama (LIANG et al., 2020), carcinoma de vesícula biliar (CHEN et al., 2019) e no câncer pancreático (XIONG et al., 2019). Deste modo, percebe-se a atuação dos lncRNAs participando de etapas da carcinogênese, os quais podem atuar como oncogenes ou supressores tumorais (LIMA, 2017).

Quanto a sua atuação como competidor endógeno, essas moléculas se caracterizam por apresentar sequências denominadas elementos de resposta a miRNAs (MREs). Dentre os lncRNAs estão a classe dos SNHGs, os quais estão presentes no núcleo e no citoplasma (YANG et al., 2019). Diante desse contexto, este trabalho se propôs fazer uma caracterização descritiva dos SNHGs (Host Gene de snoRNAs), a partir de dados públicos disponíveis e ferramentas de bioinformática, a fim de predizer o papel destas biomoléculas no câncer.

2 | METODOLOGIA

2.1 Busca e caracterização dos snoRNAs presentes em SNHGs

Foram selecionados para esta pesquisa os SNHGs mais relatados na literatura, a saber: SNHG9, SNHG2, SNHG31, SNHG22, SNHG1, SNHG28, SNHG17, SNHG18, SNHG16, SNHG12, SNHG19, SNHG14, SNHG11 e o SNHG29., Em seguida, foi realizada uma busca pelos snoRNAs que estão abrigados nos SNHGs utilizando a ferramenta (https://bioinfo-scottgroup.med.usherbrooke.ca/snoDB/). Para caracterizar os snoRNAs foram utilizadas as seguintes ferramentas: RNA central – (https://rnacentral.org/), SnoDB- (http://scottgroup.med.usherbrooke.ca/snoDB/) e snoRNAs Atlas (http://snoatlas.bioinf.uni-leipzig.de/).

2.2 Predição dos LncRNAs

Foram realizadas busca pelos níveis de expressão dos SNHGspela ferramenta UALCAN (http://ualcan.path.uab.edu/), utilizando os dados de dois tipos de tumores (Carcinoma de Células Escamosas de Cabeça e Pescoço e Câncer Cervical). Além disso, a função destas biomoléculas foi analisada pelo Lnc2cancer3.0 (http://bio-bigdata.hrbmu.edu.cn/lnc2cancer/index.html). Ademais, o software Cytoscape (https://cytoscape.org/) foi utilizado para mapear as redes de interação SNHG-miRNAs.

3 | RESULTADOS

3.1 Caracterização

De acordo com a análise realizada no snoDB, foram identificados 58 snoRNAs abrigados a SNHGs. Sendo 51 C/D Box, 6 H/ ACA Box e 1 small Cajal Body, conforme apresentado na tabela 1. Dentre os SNHGs, destaca-se o SNHG14 que abriga 21 snoRNAs, em especial os da família SNORD115 e SNORD116.

Tipos de SNHGs	snoRNAs	Tipo de snoRNA
SNHG9	SNORA78	H/ACA Box
SNHG2	SNORD81, SNORD47, SNORD80, SNORD79, SNORD78, SNORD44, SNORA103, SNORD77, SNORD76, SNORD75, SNORD74	C/D Box
SNHG31	SNORA70I	H/ACA Box
SNHG22	SCARNA17	Small Cajal Body
SNHG1	SNORD22, SNORD30, SNORD28, SNORD27, SNORD26, SNORD25, SNORD31, SNORD29	C/D Box
SNHG28	SNORD64L1	C/D Box
SNHG17	SNORA71B, SNORA71, SNORA71A, SNORA71C, SNORA71D	H/ACA Box

SNHG18	SNORD123	C/D Box
SNHG16	SNORD1C, SNORD1B, SNORD1A	C/D Box
SNHG12	SNORD99, SNORA61, SNORA44, SNORA16A	H/ACA Box
SNHG19	SNORD60	C/D Box
SNHG14	SNORD116-5, SNORD116-10, SNORD116-11, SNORD116-17, SNORD107, SNORD64, SNORD108, SNORD109, SNORD116-1, SNORD116-2, SNORD116-3, SNORD116-4, SNORD116-6, SNORD116-7, SNORD116-8, SNORD116-9, SNORD116-12, SNORD116-13, SNORD116-14, SNORD116-15, SNORD116-16, SNORD116-18, SNORD116-19, SNORD116-20, SNORD116-21, SNORD116-22, SNORD116-23, SNORD116-24, SNORD116-25, SNORD116-26, SNORD116-27, SNORD116-28, SNORD116-29, SNORD116-30, SNORD115, SNORD115-1, SNORD115-2, SNORD115-3, SNORD115-4, SNORD115-5, SNORD115-6, SNORD115-7, SNORD115-8, SNORD115-9, SNORD115-10, SNORD115-11, SNORD115-12, SNORD115-13, SNORD115-14, SNORD115-15, SNORD115-16, SNORD115-17, SNORD115-18, SNORD115-19, SNORD115-20, SNORD115-21, SNORD115-22, SNORD115-23, SNORD115-24, SNORD115-25, SNORD115-26, SNORD115-27, SNORD115-28, SNORD115-29, SNORD115-30, SNORD115-31, SNORD115-32, SNORD115-33, SNORD115-34, SNORD115-35, SNORD115-36, SNORD115-37, SNORD115-38, SNORD115-39, SNORD115-40, SNORD115-41, SNORD115-42, SNORD115-43, SNORD115-44, SNORD115-45, SNORD115-46, SNORD115-47, SNORD115-48, SNORD109B	C/D Box
SNHG11	SNORA71E, SNORA60	H/ACA Box
SNHG29	SNORD49B, SNORD49A, SNORD65	C/D Box

Tabela 1 - Caracterização dos snoRNAs abrigados em SNHGs.

Fonte: Elaborada pelos autores.

3.2 Expressão dos SNHGs de acordo com os dados TCGA

Através da ferramenta ualcan (http://ualcan.path.uab.edu/), foi possível realizar uma pesquisa dos níveis de expressão dos SNHGs em carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço e câncer cervical. Conforme demonstrado na tabela 2, o que apresentou maior nível de expressão em Carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço quando comparado com a amostra normal foi SNHG1, enquanto que SNHG3 apresentou menor expressão em tecido tumoral. Já em relação ao Câncer cervical, o SNHG3 apresentou maior expressão e o SNHG22 menor expressão.

LncRNAs	Nível de Expressão Carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço	Nível de Expressão Câncer cervical
SNHG2	Hiperexpressão	Hipoexpressão
SNHG1	Hiperexpressão	Hiperexpressão
SNHG9	Hiperexpressão	Hipoexpressão
SNHG11	Hiperexpressão	Hipoexpressão
SNHG12	Hiperexpressão	Hiperexpressão
SNHG14	Hipoexpressão	Hipoexpressão
SNHG16	Hiperexpressão	Hipoexpressão
SNHG17	Hiperexpressão	Hiperexpressão
SNHG18	Hiperexpressão	Hipoexpressão
SNHG19	Hiperexpressão	Hipoexpressão
SNHG22	Hiperexpressão	Hiperexpressão
SNHG28	Hipoexpressão	Hipoexpressão
SNHG29	Hipoexpressão	Hipoexpressão
SNHG3	Hipoexpressão	Hiperexpressão

Tabela 2 - Expressão gênica dos SNHGs em Carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (HNSC).

Fonte: Elaborada pelos autores.

3.3 Busca de SNHGs competidores endógenos

Foi realizada a busca dos microRNAs alvos desses SNHGs com auxílio do Lnc2cancer3.0 (http://bio-bigdata.hrbmu.edu.cn/lnc2cancer/index.html). Posteriormente, foi criada uma rede de interação entre os SNHGs e os miRNAs-alvos, conforme observado na figura 1. Dentre aqueles que foram pesquisados, destaca-se o SNHG1, o qual regula miR-145-5p, miR-101-3p, miR-195-5p, miR-326, miR-199a-3p, miR-140-3p, miR-338-3p, miR-182-5p, o SNHG2 que possui a capacidade de regular miR-106b, miR-135a e miR-205 e o SNHG12 que regula miR-424-5p e miR-125b.

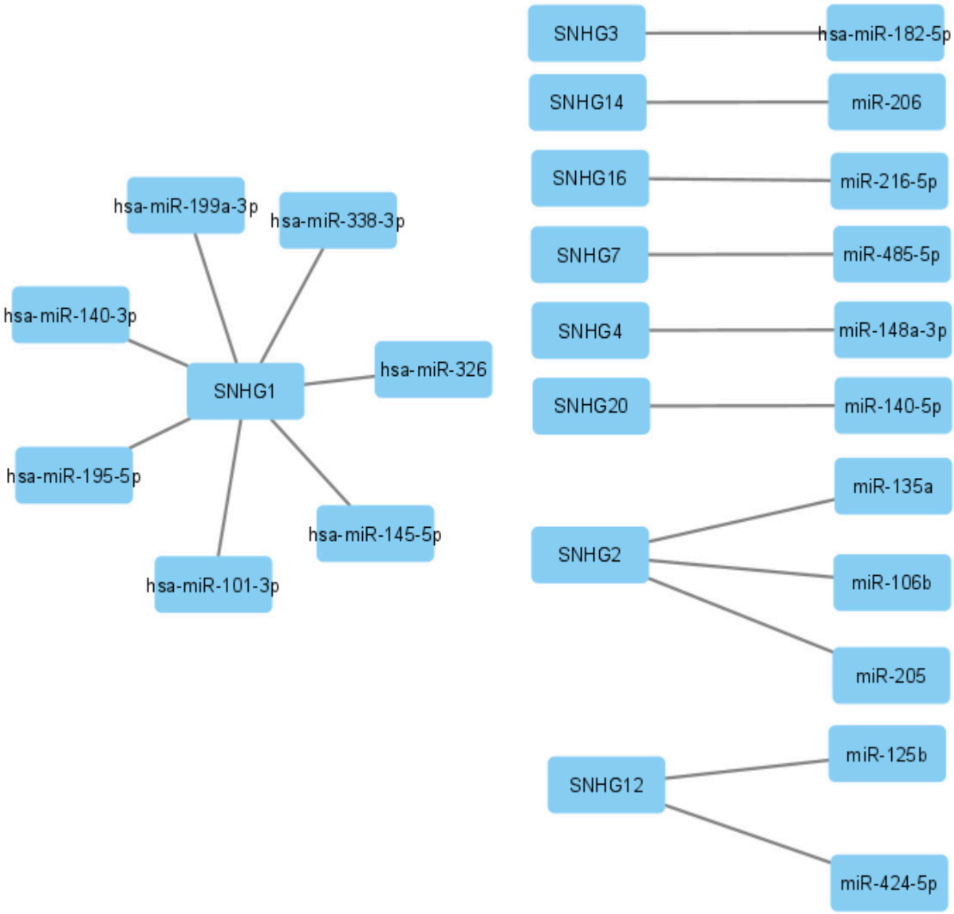


Figura 1 - Rede de interação SNHG-miRNA Alvo.

Fonte: Cytoscape.

4 I DISCUSSÃO

Os genes hospedeiros dos pequenos RNAs nucleolares (SNHGs) são visados por seu potencial em uma variedade de atividades e mecanismos de ação. Compostos atualmente por 22 membros (SNHG1 a SNHG22), eles são responsáveis por regular a proliferação, invasão, apoptose e a migração de diferentes neoplasias (SHUWEN et al., 2020). Todos os SNHGs possuem um papel na oncogênese e progressão do câncer, por meio da capacidade de transmitir informações às moléculas celulares, DNA, RNAs e proteínas (BIAGIONI et al., 2021). Isso evidencia ainda mais a importância de estudar o papel dessas biomoléculas no câncer.

Dentre os SNHGs que se destacaram neste trabalho, o SNHG2 ou GAS5, abrigou onze snoRNAs, como SNORD78, que já foi relacionado à tumorigênese do câncer de

pulmão de células não pequenas (CPCNP) (ZHENG et al., 2015) e carcinoma hepatocelular (CHC) (MA et al. 2016). Embora, a análise in sílico revele que esse lncRNA tenha expressão elevada, a literatura demonstra que pode ter uma expressão diminuída em vários tipos de tumores (YANG et al., 2019), como câncer do colo do útero (CCU) (GAO et al., 2019), câncer de mama (CMM) (FILIPPOVA et al., 2021).

Além do GAS5, merece destaque o SNHG14, que abriga o SNORD115, SNORD116. SNORD115 foi observado alterado na Síndrome de Prader-Willi (SPW) (BORTOLIN-CAVAILLÉ & CAVAILLÉ, 2012). Essa síndrome é uma desordem rara causada pela falta da expressão de genes paternos 15q11-q13 (PASSONE et al., 2018). O SNORD115 promove a síntese do Receptor de 5-hidroxitriptamina 2C (5-HT2C), que é um gene responsável por codificar um receptor acoplado à proteína G (GPCR), este neurotransmissor está envolvido em múltiplas funções tanto fisiológicas como comportamental (YAO et al.,2021).

SNHG14, vem sendo estudado devido ao seu papel funcional em muitos tipos de cânceres, sendo responsável por promover a proliferação celular e metástase (ZHANG et al., 2019). Este lncRNA tem ainda como função regular negativamente a expressão do CCU por meio da sua ligação com mir-206, atuando como um ceRNA, tendo como função inibir a progressão do câncer (JI et al., 2019).

SNHG12, por sua vez, abriga SNORA61 e SNORA44. Este lncRNA desempenha um papel oncogênico na progressão do CCU, tendo como microRNA alvo o miR-125b (JIN et al., 2018). A inibição de SNHG12 causa a proliferação, migração e invasão de células cancerígenas do CCU (LU et al.,2020). Entretanto a supressão SNHG12 inibe a ativação da via de sinalização PI3K/ Akt/ mTOR (WANG et al., 2019), via é crucial para o crescimento e sobrevivência celular, em condições patológicas e fisiológicas. Atuando como regulador chave durante o estresse para a sobrevivência, já que os tumores são formados em ambientes com limitação de nutrientes e oxigênio. Esta via se torna crucial para o câncer (PORTA et al.,2014). No entanto, a inibição desta via pode trazer a resistência tumoral. Este resultado só foi possível por meio de inibidores de PI3K/Akt/mTOR desencadeando a sensibilidade das células cancerígenas reduzindo a apoptose (LIU et al., 2020).

Um outro gene hospedeiro de RNA nucleolar pequeno é o SNHG16, o qual está relacionado como um potencial oncogene no câncer de mama (NI et al., 2020), câncer de colorretal (CCR) (CHEN et al., 2020) câncer de pulmão de células não pequenas (CPCNP) (YU et al., 2020). Quanto à função biológica desempenhada por SNHG16 no CCU, Zhu et al., 2017 demonstra em seu estudo que ele foi regulado positivamente, e esteve presente na migração e invasão via miR-216-5p/ZEB1. O SNHG16 interage como esponja em vários microRNAs, a saber: miR-520a-3p, miR-205, miR-140-5p, miR-488, miR-124-3p, miR-195 (GHAFOURI-FARD et al, 2021).

Dentre os snoRNAs abrigados neste SNHG, está o SNORD1C, este snoRNA foi observado em CCR, e avaliado como um potencial biomarcador (LIU et al.,2022). Em um outro trabalho com CCR, SNORD1C, quando superexpresso, medeia a baixa regulação

na via Wnt/β-catenina (LIU et al. 2021). A via Wnt/ β-catenina vem sendo relatada por seu grande potencial, na ativação ou inativação de oncogenes e até mesmo de genes responsáveis pela supressão de tumor.

Em relação a participação destes lncRNAs como biomarcadores de prognóstico, estas biomoléculas têm ganhado grande destaque por sua ampla expressão em diferentes tipos de câncer (LUO et al., 2017).

O uso destas biomoléculas como potencial biomarcador são de grande importância no manejo clínico, auxiliando no diagnóstico, estadiamento, resposta terapêutica e prognóstico do câncer, servindo também como novas alternativas de tratamento (LECH et al., 2016). Essas biomoléculas podem apresentar expressão diferencial no tumor, sangue ou em outros fluidos biológicos (CONTE & FONSECA et al., 2021). Além de estarem associados a baixa sobrevida e ao aspecto mais preocupante e devastador do câncer que é a metástase, e outros fatores biológicos, como: proliferação celular, apoptose, migração e invasão (JIANG et al., 2019).

Portanto, embora haja a limitação deste trabalho ser apenas uma predição, mas os dados observados dos SNHGs, em outras neoplasias, apontam sobre a importância de realizar mais estudos com estas biomoléculas, sobretudo com amostras de tecido tumoral ou fluidos biológicos (sangue, plasma, etc.) de pacientes.

5 | CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante disso, os achados evidenciam o papel dos SNHGs no câncer e sugerem que essa classe possa atuar como reguladores de proliferação, invasão, apoptose de células neoplásicas.

É importante ressaltar que este trabalho reforça a importância de estudos com SNHGs em câncer, uma vez que seus achados podem fundamentar outras pesquisas que investiguem o potencial desses genes como marcadores de diagnóstico, prognóstico e terapêutico em cânceres.

REFERÊNCIA

AKERS, C.; HOLDEN.; F. **An overview of the diagnoses and treatments for penile câncer**. British Journal of Nursig, v.29, n. 9, 2020.

ANTIQUEIRA, V. **Aspectos epidemiológicos do câncer de pênis em Mato Grosso**. Tese (Doutorado em Ciência) –Fundação Antônio Prudente em Oncologia em parceria com a Associação Mato-grossense de combate ao Câncer. São Paulo, 2020.

ATTALLA, K; PAULUCCI, D; BLUM, K; ANASTOS, H.; MOISÉS, K.; BADANI. et al. **Demographic and socioeconomic predictors of treatment delays, pathologic stage, and survival among patients with penile cancer**: A report from the National Cancer Database. Urol Oncol. 2018.

BERGERON, D.; PARAQINDES, H.; FAFARD, É.; DESCHAMPS-FRANCOEUR, G.; FAUCHER-GIGUÈRE, L.; BOUCHARD-BOURELLE, P. et al **SnoDB 2.0: an enhanced interactive database, specializing in human snornas. Nucleic Acids Research, Oxford University Press (OUP),** v. 51, n. 1, p. 291-296, 27 set. 2022.

BIAGIONI, A.; TAVAKOL, S.; AHMADIRAD, N.; ZAHMATKESHAN, M.; MAGNELLI, L.; MANDEGARY, A et al**. Small nucleolar RNA host genes promoting epithelial-mesenchymal transition lead cancer progression and metastasis**. IUBMB Life, 2021.

BLENKIRON, C.; HURLEY, D.; FITZGERALD, S.; PRINT, C.; LASHAM, A. **Links between the oncoprotein YB-1 and small non-coding RNAs in breast cancer**. PloS one, 2013.

BORTOLIN-CAVAILLÉ, M.; CAVAILLÉ, J. **The SNORD115 (H/MBII-52) and SNORD116 (H/MBII-85) gene clusters at the imprinted Prader-Willi locus generate canonical box C/D snoRNAs**. Nucleic Acids Res. 2012.

CHAN, J.J.; TAY, Y. **"Noncoding RNA:RNA Regulatory Networks in Cancer**." International journal of molecular sciences, v. 2018.

CHEN, J.; YU, Y.; LI, H.; HU, Q.; CHE, X.; HE, Y. et al. **Long non-coding RNA PVT1 promotes tumor progression by regulating the miR-143/HK2 axis in gallbladder cancer**. Mol Cancer. v.18, 2019.

CHRISTODOULIDOU, M.; SAHDEV, V.; HOUSSEIN, S.; MUNEER, A. **Epidemiology of penile cancer. Curr Probl Cancer.** v.39, p. 26-136, 2015.

CONTE, D.; FONSECA, G.S. **Os biomarcadores ideais para o rastreamento de câncer de mama e de pulmão**: uma revisão da literatura. Revista Brasileira de Análises Clínicas. v. 53, p. 41-44, 2021.

DEOGHARIA, M.; MAJUMDER, M.“**Guide snoRNAs: Drivers or Passengers in Human Disease?**” 1. ed. Biology vol. 2018.

ENGELSGJERD, J; LAGRANGE, C. **Penile Cancer**. Stats Pearls, 2021.

FALALEEVA, M.; WELDEN, J.; DUNCAN, M.; STAMM, S. **C/d-box snoRNAs form methylating and non-methylating ribonucleoprotein complexes: Old dogs show new tricks**. BioEssays: news and reviews in molecular, cellular and developmental biology. v.39, 2017.

FANTAPPIÉ, M. **Epigenética e Memória Celular**. Revista Carbono, n.3, 2013.

FERRÁNDIZ-PULIDO, C.; DE TORRES, I.; GARCÍA-PATOS, V. **Carcinoma escamoso de pene Penile squamous cell carcinoma**. Actas Dermosifiliogr. v.103, p.478-87, 2012.

FICARRA, V.; AKDUMAN, B.; BOUCHOT, O.P.; MACHADO-TOBIAS, M. **Prognostic Fantors in Penile Cancer**. Urology. v.76, 2010.

FOUAD, Y.A.; AANEI, C. **Revisiting the hallmarks of cancer**. Am J Cancer Res.v.7, p. 1016-1036, 2017.

FURTADO, C.L.; LUCIANO, M.S.; SANTOS, R.S.; FURTADO, G.P.; MORAES, M.; PESSOA, C. **Epidrugs**: **targeting epigenetic marks in cancer treatment**. Epigenetics, p.1164–1176, 2019.

GAO, J.; LIU, L.; LI, G.; CAI, M.; TAN, C.; HAN, X. et al. **LncRNA GAS5 confers the radio sensitivity of cervical cancer cells via regulating miR-106b/IER3 axis.** Int J Biol Macromol. 2019.

GHAFOURI-FARD, S; KHOSHBAKHT, T; TAHERI, M; SHOJAEI, S. **A Review on the Role of Small Nucleolar RNA Host Gene 6 Long Non-coding RNAs in the Carcinogenic Processes**. Front Cell Dev Biol. 2021.

HAKENBERG, O.; DRÄGER, D.; ERBERSDOBLER, A.; NAUMANN C.; JUNEMMAN K; PROTZE, C. **The Diagnosis and Treatment of Penile Cancer**. 39. ed. Dtsch Arztebl Int. p. 646-652, 2018.

HRISTOVA, V. A., & CHAN, D. W. **Cancer biomarker discovery and translation: proteomics and beyond.** Expert review of proteomics, v. 16, n. 2, p. 93-103, 2019.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **Câncer de Pênis**. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. – Rio de Janeiro: INCA, 2018.

JI, N.; WANG, Y.; BAO, G.; YAN, J.; JI, S. **LncRNA SNHG14 promotes the progression of cervical cancer by regulating miR-206/YWHAZ**. Pathol Res Pract. 2019.

JIN, X.J.; CHEN, X.J.; ZHANG, Z.F.; HU, W.S.; OU, R.Y.; LI, S. et al. **Long noncoding RNA SNHG12 promotes the progression of cervical cancer via modulating miR-125b/STAT3 axis. J Cell Physiol**. v.234, n.5, p. 6624-6632, 2019.

JOHNSTON, M.; NIGAM, R. **Recent advances in the management of penile cancer**. Faculty Rev, 2019.

KISS, A.; JÁDY, B.; DARZACQ, X.; VERHEGGEN, C.; BERTRAND, E., KISS, T.. **A Cajal body-specific pseudouridylation guide RNA is composed of two box H/ACA snoRNA-like domains**. Nucleic Acids Res. v. 20, p.4643-4649, 2002.

KOPP, F.; MENDELL, J. **Functional Classification and Experimental Dissection of Long Noncoding RNAs**. 3. ed. Cell. v.172, p. 393-407, 2018.

LECH, G.; SŁOTWIŃSKI, R.; SLODKOWSKI, M.; KRASNODEBSKI, I. **Colorectal cancer tumour markers and biomarkers: Recent therapeutic advances**. World J Gastroenterol. 2016.

LIANG, Y.; SONG, X.; LI, Y.; CHEN, B.; ZHAO, W.; WANG, L. et al. **LncRNA BCRT1 promotes breast cancer progression by targeting miR-1303/PTBP3 axis**. Mol Cancer. v.19, 2020.

LIMA, T.S. **Análise da expressão de longos RNAs não codificantes em linhagem de câncer de mama.** Trabalho de conclusão de curso (Bacharel em Ciências Biológicas) - Universidade Federal do Paraná Curitiba, 2017.

LINS, P.R.B. **Descobrindo redes de associação envolvendo miRNAs e lincRNAs humanos através de uma análise de eQTL**. Dissertação (Mestrado em Bioinformática) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2018.

LIU, R.; CHEN, Y.; LIU, G.; LI, C.; SONG, Y.; CAO, Z. et al. **PI3K/AKT pathway as a key link modulates the multidrug resistance of cancers**. Cell Death Dis. 2020.

LIU, Y.; ZHAO, C.; SUN, J.; WANG, G.; JU, S.; QIAN, C. et al. **Overexpression of small nucleolar RNA SNORD1C is associated with unfavorable outcome in colorectal cancer**. Bioengineered. 2021.

LIU, Y.; ZHAO, C.; WANG, G.; CHEN, J.; JU, S., HUANG, J. et al. **SNORD1C maintains stemness and 5-FU resistance by activation of Wnt signaling pathway in colorectal cancer**. Cell Death Discov. 2022.

LU, C.; WEI, Y.; WANG, X.; ZHANG, Z.; YIN, J.; LI, W. et al. **DNA-methylation-mediated activating of lncRNA SNHG12 promotes temozolomide resistance in glioblastoma**. Mol Cancer. 2020.

LUO, P.; LIU, X.; WANG, Y.; LI, N.D.; LIAO, S.; YU, M.X. et al. **Prognostic value of abnormally expressed lncRNAs in ovarian carcinoma: a systematic review and meta-analysis**. Oncotarget. 2017.

MA, P.; WANG, H.; HAN, L.; JING, W.; XIN, Z.; ZHISI, L. **Up-regulation of small nucleolar RNA 78 is correlated with aggressive phenotype and poor prognosis of hepatocellular carcinoma.** Tumor Biol, 2016.

MA, Q.; QI, X.; LIN, X.; LI, L.; CHEN, L.; HU, W. **LncRNA SNHG3 promotes cell proliferation and invasion through the miR-384/hepatoma-derived growth factor axis in breast cancer**. Hum Cell. 2020.

MACEDO, J.; SILVA, E.; NOGUEIRA, L.; COELHO, R.; SILVA, J.; SANTOS, A. et al. **Genomic profiling reveals the pivotal role of hrHPV driving copy number and gene expression alterations, including mRNA downregulation of TP53 and RB1 in penile cancer**. 6. Ed. Mol Carcinog. v.59, p. 604-617,2020.

MANNOOR, K.; LIAO, J.; JIANG, F. **Small nucleolar RNAs in cancer**. Biochim Biophys Acta. v.1826, p.121-128, 2012.

MARCHIONI, M.; BERARDINELLI, F.; NUNZIO, C.; SPIESS, P.; PORPIGLIA, F.; SCHIPS, L. et al. **New insight in penile cancer**. Minerva Urol Nefrol. p.559-569, 2018.

MOURKSI, N.E.H.; MORIN, C.; FENOUIL, T.; DIAZ, J.J.; MARCEL V. **snoRNAs Offer Novel Insight and Promising Perspectives for Lung Cancer Understanding and Management**. Cells, 2020.

NI, C.; FANG, Q.Q.; CHEN, W.Z.; JIANG, J.; JIANG, Z.; YE, J. et al. **Breast cancer-derived exosomes transmit lncRNA SNHG16 to induce CD73+γδ1 Treg cells**. Signal Transduct Target Ther. 2020.

OLIVEIRA, N.F.; PLANELLO, A.C; ANDRIA, D.C.; PARDO, A.P.S. **Metilação de DNA e Câncer**. 4. ed. Revista Brasileira de Cancerologia v.56, p.493-499, 2010.

PASSONE, C.B.G.; PASQUALUCCI, P.L.; FRANCO, R.; ITO, S.S.; MATTAR, L.B.F.; KOIFFMANN, CP. et al. **PRADER-WILLI SYNDROME: WHAT IS THE GENERAL PEDIATRICIAN SUPPOSED TO DO**? - A REVIEW. Rev Paul Pediatr, 2018.

PINHO, J.D.; SILVA, G.E.B.; TEIXEIRA-JÚNIOR, A.A.L.; BELFORT, M.R.; MENDES, J.M. et al. MIR-107, MIR-223-3P and MIR-21-5P Reveals **Potential Biomarkers in Penile Cancer**. Asian Pac J Cancer Prev. v. 21, p. 391-397, 2020.

PINHO, J.D.; SILVA, G.E.B.; TEIXEIRA-JÚNIOR, A.A.L.; ROCHA, T.M.S.; BATISTA, L.L.; SOUSA, A.M. et al. **Non-Coding RNA in Penile Cancer**. Front Oncol. 2022.

POMPEO, A.C.L.; ABRAMS, P. **Penile** câncer. 2. ed. Urology. v.76, 2010.

PORTA, C.; PAGLINO, C.; MOSCA, A. **Targeting PI3K/Akt/mTOR Signaling in Cancer**. Front Oncol, 2014.

QIN, Y.; SUN, W.; WANG, Z; DONG, W.; HE, L.; ZHANG, T.; ZHANG, H. **Long Non-Coding Small Nucleolar RNA Host Genes (SNHGs) in Endocrine-Related Cancers**. Onco Targets Ther. v.13, p.7699-7717, 2020.

RODRIGUES, A.H.F.; ALBUQUERQUE, C.P.C.; CAVALCANTE, C.D.; PEIXOTO, A.Silva. **Mecanismo epigenéticos no câncer de mama: O papel dos biomarcadores e da medicina persolnalizada**. Revista Interscientia, v.7, n.2,

ROMANO, G.; VENEZIANO, D.; ACUNZO, M.; CROCE, C.M. **Small non-coding RNA and cancer. Carcinogenesis.** p. 485-491, 2017.

SHI, J.; DING, W.; LU, H. **Identification of Long Non-Coding RNA SNHG Family as Promising Prognostic Biomarkers in Acute Myeloid Leukemia**. Onco Targets Ther. 2020.

SHUWEN, H.; XI, Y.; QUAN, Q; YIN, J; MIAO, D. **Can small nucleolar RNA be a novel molecular target for hepatocellular carcinoma? Gene**. 2020.

SUN, X; WANG, Z; YUAN, W**. Down-regulated long non-coding RNA SNHG1 inhibits tumor genesis of colorectal carcinoma**. Cancer Biomark. 2017.

THORENOOR, N.; SLABY, O. **Small nucleolar RNAs working and potencial roles in cancer**. Tumor Biol. v.36, p. 41–53, 2015.

VARELA, M.A.; ROBERTS T.C.; WOOD, M.J. **Epigenetics and ncRNAs in brain function and disease: mechanisms and prospects for therapy**. Neurotherapeutics. 2013.

VUICHOUD, C.; KLAP, J.; LOUGHLIN, K. **The Emerging Role and Promise of Biomarkers in Penile Cancer**. Urol Clin North Am. v.43, p.135-143, 2016.

WANG, K.; CHANG, H.. **Molecular mechanisms of long noncoding RNAs**. Mol cell. v.43, p. 904 - 914, 2011.

XIONG, G.; LIU, C.; YANG, G.; FENG, M.; XU, J.; ZHAO, F. et al. **Long noncoding RNA GSTM3TV2 upregulates LAT2 and OLR1 by competitively sponging let-7 to promote gemcitabine resistance in pancreatic cancer**. J Hematol Oncol. v.12, 2019.

YANG, H.; JIANG, Z.; WANG, S.; ZHAO, Y.; SONG, X.; XIAO, Y. et al. **Long non-coding small nucleolar RNA host genes in digestive cancers**. Cancer Med. v.18, p. 7693-7704, 2019.

YANG, X.; XIE Z.; LEI X.; GAN, R. **"Long non-coding RNA GAS5 in human cancer**." Oncology letters vol. 20,3 (2020): 2587-2594.

YAO, T.; HE, J.; CUI, Z; WANG, R.; BAO, K.; HUANG, Y. et al. **Central 5-HTR2C in the Control of Metabolic Homeostasis**. Frontiers in endocrinology, 2021.

YU, Lin; CHEN, Dewen; SONG, Jie. **LncRNA SNHG16 promotes non-small cell lung cancer development through regulating EphA2 expression by sponging miR-520a-3p**. Thorac Cancer. 2020. Doi: 10.1111/1759-7714.13304.

ZHANG, L.; LU, Q.; CHANG, C. **Epigenetics in Health and Disease**. Adv Exp Med Biol. 2020.

ZHANG, P.; KANG, J.Y.; GOU, L.T et al. **MIWI and piRNA-mediated cleavage of messenger RNAs in mouse testes**. Cell Res. v.25, p. 193-207, 2015.

ZHENG, D.; ZHANG, J.; NI, J.; LU, J.; WANG, J.; TANG, L.; ZHANG, L.; WANG, L.; XU, Jianfang.; SU, B.; CHEN, G**. Small nucleolar RNA 78 promotes the tumorigenesis in non-small cell lung cancer**. J Exp Clin Cancer Res, 2015.

ZHU, H.; ZENG, Y.; ZHOU, C.C.; YE, W. **SNHG16/miR-216-5p/ZEB1 signal pathway contributes to the tumorigenesis of cervical cancer cells. Arch Biochem Biophys**. 2018.

CAPÍTULO 2

PERFIL FENOTÍPICO DA VIRULÊNCIA DE *Escherichia coli* ISOLADAS DE PACIENTES COM CÂNCER DE RETO

Data de submissão : 09/06/2023 *Data de aceite: 03/07/2023*

Filipe Menezes
Laboratório de Anaeróbios, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo
http://lattes.cnpq.br/1857769250721550

Rosa Liliana Solis Castro
Laboratório de Anaeróbios, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo
http://lattes.cnpq.br/0899037377396906

Gabriela Gama Freire Alberca
Laboratório de Anaeróbios, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo
http://lattes.cnpq.br/0958803779904788

Patrícia Lima Falcão
Centro de Biotecnologia, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo
http://lattes.cnpq.br/4014111088312457

Amanda Palermo Nunes
Centro de Biotecnologia, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo
http://lattes.cnpq.br/8854848436796574

Dino Seigo Gushiken Junior
Centro de Biotecnologia, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo
http://lattes.cnpq.br/8399960698307010

Stephanie Angelo Pomin
Centro de Biotecnologia, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo
http://lattes.cnpq.br/5516242393511713

Larissa Andrade Almeida
Centro de Biotecnologia, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo
http://lattes.cnpq.br/9566598831396569

Ariane Cristina Nicolau Torres
Hospital Paulista de Medicina, Departamento de Ginecologia, Universidade Federal de São Paulo
http://lattes.cnpq.br/3534698387975900

Carlos Roberto Jorge Soares
Centro de Biotecnologia, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo
http://lattes.cnpq.br/3805602544840562

Mario Julio Avila-Campos
In memorian. Orientador
Laboratório de Anaeróbios, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo
http://lattes.cnpq.br/0482640932572574

RESUMO: Neste estudo foram avaliados alguns fatores de virulência de cepas de *E. coli* isoladas de fezes de pacientes com câncer de reto (CR) e indivíduos sadios (PS). Foi observada uma diferença estatística na resistência a 60°C por 30 e 60 minutos em cepas de pacientes com CR. A maioria das cepas de ambos os pacientes, resistentes à temperatura, foram móveis e todas as cepas de CR resistentes a 60°C por 60 minutos produziram motilidade. A produção de bacteriocinas foi observada nas cepas isoladas de ambos os grupos de pacientes, com uma tendência maior para inibir cepas de CR. A maioria de cepas foram sensíveis aos antibióticos, mas resistentes aos metais pesados testados. É importante, notar que as cepas de CR resistentes a antibióticos foram mais produtoras de neuraminidase em relação às cepas isoladas de PS. A associação da resistência ao trimetoprima, sulfametoxazol e bicloreto de mercúrio foi observado na concentração de 16 μg. O fenótipo para α-hemólise foi detectado predominantemente entre as cepas de CR.
PALAVRAS-CHAVE: *Escherichia coli*; Câncer de reto; Perfil fenotípico de virulência.

PHENOTYPIC PROFILE OF THE VIRULENCE OF *Escherichia coli* ISOLATED PROM PATIENTS WITH RECTAL CANCER

ABSTRACT: In this study, were evaluated some virulence factors *of E. coli* strains isolated from feces of patients with rectal cancer (RC) and healthy patients (HP). A statistical difference was observed in strains isolated from RC patients, who were resistant at 60 ° C for 30 and 60 minutes. Most of the strains of both patients, resistant to temperature were mobile, and all RC strains resistant at 60 ° C for 60 minutes produced motility. The production of bacteriocins was observed in both groups with a greater tendency to inhibit RC strains. Most were sensitive to antibiotics but resistant to the heavy metals tested. It is important to note that antibiotic-resistant RC strains were more neuraminidase-producing than HP isolates. The resistance association to trimethoprim, sulfamethoxazole and mercuric bichloride was observed at the concentration of 16 µg. The phenotype for α-hemolysis was detected predominantly among RC strains.
KEYWORDS: *Escherichia coli*; Rectal cancer; Phenotypic profile.

INTRODUÇÃO

Escherichia coli é uma bactéria pertencente à Família *Enterobacteriaceae*. É um bacilo Gram-negativo, facultativo, não esporulado e geralmente móvel com flagelos peritríquios, crescendo em temperaturas ótima entre 35 – 40°C (Bell e Kyriakides, 2002), além de possuir estratégias para sobreviver em temperaturas críticas (Murata et al., 2011).

Normalmente, interage de forma benéfica com o hospedeiro e é considerada membro da microbiota residente do intestino. Entretanto, existem cepas envolvidas em processos diarréicos (Kaper et al., 2004).

Os diferentes fatores de virulência expressos, tais como a resistência a ambientes estressantes (Kaur et al., 1998), fatores de colonização, produção de hemolisina, capacidade de invadir células epiteliais do intestino, produção de toxinas (Bell e Kyriakides, 2002) e resistência antimicrobiana (Al-Otaibi et al., 2016), permitem a associação dessas bactérias a uma grande variedade de doenças. Já foi demonstrado que enterobactérias, especialmente *E. coli,* são encontradas em abundância nas doenças inflamatórias do trato gastrintestinal (Winter et al., 2013).

Processos inflamatórios por períodos longos podem resultar em danos ao DNA facilitando a instalação e desenvolvimento de células degenerativas que precedem o aparecimento de algum tipo de câncer (Sjöqvis et al., 2005). Martin et al. (2004), observaram que em pacientes com câncer colorretal (CCR), *E. coli* estava mais associada e internalizada à mucosa em relação aos controles. No entanto, não está definido se o CCR é promovido pela inflamação causada pela *E. coli* ou outros microrganismos ou mesmo pela alteração na expressão de genes microbianos específicos (Michaud et al.,2004).

Estudos recentes demonstraram forte associação entre o desenvolvimento do CCR e bactérias intestinais, onde danos no DNA causados por radicais superóxido, formação de genotoxinas, aumento da proliferação das células T e outros fatores, contribuiriam para o desenvolvimento do câncer (Toprak et al., 2006; Ramos et al., 2010).

Dentre os diferentes tipos de câncer que acometem a espécie humana, o CCR é o terceiro em maior em incidência e o segundo em termos de mortalidade. Estima-se que até o ano de 2035, o número total de mortes por câncer retal e de cólon aumentará 60% e 71,5% respectivamente (Douaiher et al., 2017). A maioria dos casos de CCR se dá de forma esporádica, surgindo mutações somáticas e clones tumorais que podem ser causados por infecções bacterianas. Existem indícios que fatores de virulência estão envolvidos diretamente como desenvolvimento do CCR (Cuevas-Ramos et al., 2010), pois se verifica uma enorme variabilidade das características fenotípicas e genotípicas bacterianas, sendo de interesse avaliar o perfil virulento de bactérias participando desses processos.

Tendo em vista a importância de *Escherichia coli* no ecossistema intestinal e pela sua possível associação como desenvolvimento do CCR, neste estudo se propôs determinar o perfil fenotípico de alguns fatores de virulência em cepas isoladas de pacientes diagnosticados com câncer de reto (CR).

MATERIAL E MÉTODOS

1. **Cepas bacterianas.** Foram usadas 23 cepas de *E. coli* isoladas e identificadas no Laboratório de Anaeróbios do Departamento de Microbiologia do ICB, USP. Foram

obtidas de fezes coletadas de 13 pacientes diagnosticados com câncer de reto. Também, foram usadas 16 cepas obtidas de 10 indivíduos sadios sem câncer de reto, conforme determinado por exame de colonoscopia. Esses indivíduos foram atendidos no Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP). Todos os participantes assinaram o Termo de Livre Consentimento aprovados pelos Comitês de Ética do ICB (Proc. No. 1236/CEPSH) e da Faculdade de Medicina (Proc. No. 321/14) da Universidade de São Paulo.

2. **Testes Fenotípicos.** As cepas foram reativadas em Agar MacConkey e incubadas a 37 °C por 18 a 24 horas, e mantidas em ágar Luria para a realização dos testes bioquímicos.

2.1. Resistência à Temperatura (Holdeman et al., 1977). Alíquotas de 0,1 ml de culturas de 24 horas em caldo BHI suplementado foram transferidas para tubos contendo 5ml do mesmo meio e levados a banho-maria, a 60°C, por 30 e 60 minutos, e a 100°C, por 1 e 10 minutos. Decorridos esses tempos os tubos foram incubados em aerobiose, a 37°C, por 24horas. A turvação do meio foi indicativa de crescimento bacteriano e interpretado como resistência ao calor. Tubos com caldo BHI inoculados, não expostos ao calor, foram usados como controle de viabilidade celular bacteriana.

2.2. Produção de Motilidade, H_2S e Indol (Holdeman et al., 1977). Foi utilizado o meio Sulfide Indole Motility (SIM, Difco). Esse meio foi inoculado em picada e incubado em condições de aerobiose, a 37°C, por 24 horas. Após incubação foi observada a motilidade, e o enegrecimento do meio indicou a produção de sulfeto de hidrogênio. A produção de indol foi detectada pela cor púrpura na superfície do meio, após a adição do reativo de Kovacs. A cepa *E. coli* ATCC25922 foi usada como controle positivo.

2.3. Determinação da susceptibilidade a antibióticos e a metais pesados (Sutter et al., 1979; Riley e Mee,1982; CLSI, 2016). A susceptibilidade aos antibióticos e metais pesados foi determinada pelo método de disco difusão, usando-se o meio Müeller-Hinton. Os antibióticos testados foram: ampicilina (10 μg), amoxicilina + ácido clavulânico (10 μg), cefalotina (30 μg), cefazolina (30 μg), cefotaxima (30 μg), cefuroxima (30 μg), ceftriaxona (30 μg), ceftazidima (30 μg), cefepime (30 μg), meropenem (10 μg), aztreonam (30 μg), ácido nalidíxico (30 μg), nitrofurantoína (30 μg), norfloxacina (10 μg), ciprofloxacina (5 μg), ofloxacina (5 μg), levofloxacina (5 μg), estreptomicina (10 μg), amicacina (30 μg), gentamicina(10 μg), azitromicina (15 μg), cloranfenicol(30 μg), tetraciclina(30 μg), trimetoprima/sulfamteoxazol (5 μg), polimixina b (300 UI). A cepa *E. coli* ATCC 25922 foi utilizada como controle. Para a colistina foi utilizado o método de microdiluição em caldo Muller Hinton ajustado com cálcio em concentrações do antimicrobiano variando de 0,125 a 128 μg/ml. Como cepa controle foi utilizada a bactéria *Proteus mirabillis* ATCC 25933 resistente à colistina. Para verificar a concentração inibitória mínima (CIM), foi usado o corante resarzurina (azul) e a mudança de cor para rosa, nos poços com as concentrações da droga, indicou o crescimento bacteriano e resistência bacteriana à referida concentração.

O método de diluição em ágar foi utilizado para os íons metálicos: bicloreto de mercúrio ($HgCl_2$), nitrato de prata ($AgNO_3$), sulfato de cobre ($CuSO_4$), sulfato de níquel ($NiSO_4.6H20$), sulfato de cádmio ($3CdSO_4.8H2O$) e cloreto de chumbo ($PbCl_2$). As concentrações dos metais variaram de 1 a 32 μg/ml. Meios sem agentes antimicrobianos foram usados como controle. O inóculo foi padronizado para 1,5 x 10^8células/ml com auxílio da escala 0,5 de McFarland. As placas foram inoculadas, em duplicata, usando-se o replicador Steers e incubadas a 37 °C, por 24 horas. A concentração inibitória mínima (CIM) foi definida como a menor concentração de cada agente capaz de inibir totalmente o crescimento macroscópico dosorganismos. O ponto crítico usado foi de 2 μg/ml.

2.4. Detecção da Produção da Enzima β-Lactamase (Booth et al., 1977). As espécies resistentes à penicilina G foram utilizadas para verificar a produção da enzima β-lactamase. 20 μl das bactérias foram inoculadas, em duplicata, em Agar BHI com 8 e 32μg/ml de penicilina e incubados (37°C, 24 h). Em seguida, o crescimento bacteriano foi exposto a vapores de clorofórmio durante 20 minutos, deixando posteriormente as placas entreabertas para a evaporação do clorofórmio, por mais 20 minutos. Então, foi adicionada uma camada de 3 ml de meio BHI semi-sólido (0,7% de ágar) inoculado com a cepa reveladora de *E. coli* sensível à penicilina, e após nova incubação, o aparecimento de um halo de crescimento foi considerado como produção da enzima.

2.5. Produção de Bacteriocinas (Booth et al., 1977). Foi verificada pelo método da dupla camada, em placas contendo ágar BHI (Brain Heart Infusion, Difco) suplementado com extrato de levedura (0,5%). As bactérias produtoras foram semeadas em spot com alça de platina,e incubadas em aerobiose, a 37°C, por 24 horas. Após o tempo de incubação, as culturas foram submetidas à ação do vapor de clorofórmio, por 20 minutos. Decorrido esse período, as placas permaneceram entreabertas, por 20 minutos, para eliminação dos resíduos de clorofórmio. Em seguida, o crescimento bacteriano foi coberto com 3,0 ml de BHI semi-sólido (0,7% de ágar) inoculado com 0,1 ml de uma cultura líquida de 24 horas (cepa reveladora com 1,5 x 10^8células/ml). As placas foram incubadas em aerobiose, a 37°C, por 24 horas, observando-se a presença ou a ausência de halos de inibição da bactéria reveladora. Todas as espécies foram testadas contra elas mesmas. Foi definida como auto-antagonismo a produção de bacteriocina por uma espécie contra ela mesma; iso-antagonismo, a produção por uma espécie contra outra espécie do mesmo gênero; e hetero-antagonismo, a produção por uma espécie contra outra de gênero diferente, neste caso foi usada a cepa *Proteus mirabilis* ATCC 25933.

2.6. Detecção da produção e da inibição da atividade da enzima neuraminidase (Holdeman et al., 1977). Foi determinada em placas de microtitulação, utilizando-se sangue de humano coletado em solução Alsever e mantido a 4 °C, até uma semana. As células bacterianas foram cultivadas em caldo BHI (37 °C, 24 h), lavadas três vezes em PBS (0,01M, pH 7,3) (12.000 g, 10 minutos) e ressuspendidas a 1,5 x 10^8bactérias/ml. Em seguida, 1 ml do inóculo bacteriano foi misturado com 10 μl de hemácias (1%) previamente levadas, sendo essa mistura cuidadosamente

homogeneizada e incubada a 37 °C, por uma noite. Em seguida, nas microplacas, foram realizadas diluições seriadas, em base 2, adicionando-se 18 μl de PBS e 2 μl de lectina de amendoim (*Arachis hypogaea* PNA, Sigma Chemical Co., USA). Posteriormente, a cada diluição foram adicionados 20 μl da mistura bactérias-eritrócitos (1%), sendo homogeneizados e incubados a 37°C, por 1 hora, seguido de incubação a 4°C, por uma noite. A produção da neuraminidase foi considerada quando houve aglutinação (bactéria-lectina-eritrócitos). Em cada ensaio foi utilizada a mistura de bactérias e de eritrócitos, sem a adição de lectina como controle negativo da reação(precipitação).

A inibição da produção em placas de microtitulação, como anteriormente descrito, e tratando-se as bactérias com 1 ml de galactose (1mM). Assim, a mistura foi cuidadosamente homogeneizada e incubada à temperatura ambiente, por 30 minutos, para a sensibilização das células bacterianas. Em seguida, a mistura foi concentrada por centrifugação (12.000 g, 10minutos), e lavada uma vez, em PBS.

Em seguida, foram adicionados nas microplacas 18 μl de PBS e 2 μl de lectina realizando-se diluições seriadas, em base 2. Posteriormente, a cada diluição foram adicionados 20 μl de bactérias sensibilizadas com galactose e 20 μl de uma suspensão de eritrócitos (1%). As placas foram homogeneizadas e incubadas a 37 °C, por 1 hora e a inibição da enzima foi observada pela inibição da aglutinação dos eritrócitos. Em cada ensaio foi utilizado como controle negativo uma mistura debactéria-eritrócito-lectina.

2.7. Produção de Hemolisinas (Avila-Campos,1995). Foi determinada em placas contendo ágar com 5% de sangue desfibrinado de cavalo e foi realizado outro teste com sangue de carneiro. As placas foram inoculadas em duplicata com o replicador de Steers (Cefar LTDA., São Paulo, SP), transferindo um inoculo final de 10^5células/ml/ponto, a partir da cultura padronizada em 1,5x 10^8células/ml (A_{550nm}= 0,4). A formação de halo claro ao redor do crescimento indicou hemólise total.

3. Análise estatística. Os dados foram avaliados com o teste Chi-Square. Nível de significância de $P \leq 0,05$ (*).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todas as cepas avaliadas foram sensíveis à temperatura de 100°C, porém a 60 °C por 30 minutos 52,2 % das cepas CR e 18,8% das cepas de PS foram resistentes. Somente cepas de CR foram resistentes a 60°C por 60 minutos, sendo 50% das resistentes por 30 minutos. Quando foi realizado o test de Chi-square, houve diferença estatística significativa das cepas de ambos os grupos em relação a resistência a 60°C/30min e 60°C/60min (Gráfico 1). Jenkins, Schultz e Martin (1988) demonstraram uma proteção cruzada em *E. coli* produtora de proteínas de choque térmico quando submetida a inanição à glicose e exposta ao peróxido de hidrogênio. O microambiente do câncer apresenta elevada taxa de consumo de glicose pelas células cancerígenas e produzem

grande quantidade de peróxido de hidrogênio (Szatrowski e Nathan, 1991; Fang e Fang, 2016), isso poderia explicar porque apenas as cepas de CR foram resistentes por um tempo maior de exposição à temperatura.

A motilidade foi observada em 60,9% das cepas de CR e 75% das cepas de PS e não foi observada diferenças estatística entre elas ($P = 0,357$), baseado no Chi-square test (α=95%; $P< 0,05$). No entanto, a produção de motilidade parece estar relacionada com a resistência a temperatura, pois 67% das cepas resistentes a 60°C por 30 minutos em ambos os pacientes e todas as seis cepas de CR resistentes a 60°C por 60 minutos produziram motilidade. A bioestabilidade da motilidade pode permitir que as bactérias realizem uma divisão do trabalho, onde células com motilidade contribuem para a infecção, enquanto as células imóveis sirvam como reservatório (Saini et al., 2008; Stewart e Cookson, 2014). Samanta et al. (2013) informaram que a expressão do regulador flagelar (*FlhD/FlhC*) em *E. coli* era limitada ao biofilme em momentos específicos da sua formação, enquanto, Horne et al. (2016) demonstraram que com o tempo, cepas de *E. coli* altamente móveis produziam biomassa com cada vez menos isolados móveis. Também tem sido detectada a presença de biofilme em tecidos adjacentes ao tumor quando esse era coberto por biofilme (Dejea et al., 2014). Isso pode levar a hipótese de que um ambiente estressante, como o do tecido cancerígeno, levaria as cepas a migrar para o ao redor desse ambiente, onde possivelmente encontrariam biofilmes com menos cepas móveis, aumentando dessa forma o volume e a estabilidade desse biofilme.

A Tabela 1 apresenta o perfil de susceptibilidade aos antibióticos, onde é possível visualizar que os antibióticos que foram mais eficientes contra todas as cepas de ambos os pacientes foram: ceftriaxona, norfloxacin, ciprofloxacin, ofloxacin, levofloxacin, amicacina, gentamicina e colistina, pois nenhuma cepa testada ficou na zona intermediária e foram sensíveis. A resistência foi observada contra algumas das drogas testadas, 13% das cepas de CR e o 18,5% das cepas de PS foram Multi Droga Resistentes (MDR).

Sensibilidade para Trimetoprima Sulfametoxazol foi observada em 87% das cepas de CR e 68,8% de PS. Um número expressivo de cepas ficou na zona intermediária para alguns dos antibióticos. Todas as cepas que apresentaram resistência a algum dos β-lactâmicos foram positivas para a produção da enzima β-lactamase.

A presença de metais pesados nas indústrias, na agricultura e em hospitais tem colaborado para a seleção e disseminação de cepas resistentes a metais pesados, e essa resistência pode estar intimamente relacionada à resistência aos antibióticos (Smith, 1967; Ahonkai; Pugh; Russell, 1984). Todas as cepas testadas foram resistentes à maioria dos metais testados na concentração usada de 2 μg/mL. Para o bicloreto de mercúrio foi observada resistência na concentração de 16 μg/mL. Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada na susceptibilidade ao $HgCl_2$ ($P = 0,802$).

Todas as cepas resistentes a $HgCl_2$(16 μg/mL), também foram resistentes à Trimetoprima Sulfametoxazol, conforme observado na Tabela 2. O determinante da

resistência ao mercúrio pode ser de origem plasmidial o cromosomal, sendo codificada pelo gene *mer,* podendo coexistir com genes de resistência a algum antibiótico nos plasmidios (Nascimento, Chartone-Souza, 2003). A correlação entre a trimetoprima, sulfametoxazol e tetraciclina com o bicloreto de mercúrio tem sido observado em *E. coli* (Silva et al., 2006).

No geral, o resultado do teste de susceptibilidade a antibióticos foi intrigante, revelando mais cepas sensíveis em CR (60,9%), quando comparado a PS (43,8%). Além disso, foram encontradas mais cepas produtoras de β-lactamase em PS do que em CR. Não obstante, as cepas de PS também foram mais resistentes aos metais pesados. Esse resultado pode ter relação com a competição entre as bactérias, devido à produção de bacteriocinas.

A produção de bacteriocinas foi observada em 13% das cepas de pacientes com CR e 18,8% das cepas de PS. Na Tabela 3 é possível visualizar que elas foram capazes de inibir cepas de ambos os grupos, com uma tendência maior para a inibição das cepas de CR. A cepa CR20 e a de PS36, se destacaram por inibir um número elevado das cepas testadas. Todas as cepas produtoras de bacteriocinas foram sensíveis aos antibióticos testados, exceto pela cepa PS36 que foi MDR. Em contrapartida, a maior parte das cepas resistentes aos antibióticos de ambos os pacientes foram inibidas pela maioria das cepas produtoras de bacteriocina, o que poderia favorecer a colonização por cepas sensíveis aos antibióticos, inibindo o crescimento das cepas resistentes aos antibióticos nos pacientes com CR.

Os estudos que determinam o perfil de susceptibilidade a antibióticos da *E. coli* em pacientes com infecção sanguínea, apontam maior resistência entre as isoladas de pacientes com CCR do que de pacientes sem câncer (Al-Otaibi et al., 2016; Magalhães et al., 2014). É importante lembrar que, esses isolados de pacientes com infecção, geralmente são isolados de hemoculturas e de pacientes que já estão em tratamento, diferente do nosso trabalho, onde os isolados são de fezes e de pacientes que ainda não receberam o tratamento. Autores evidenciaram que as bactérias produtoras de β-glucuronidases como a *Escherichia coli* e *Clostridium perfringens* encontram-se aumentadas após a quimioterapia com o Irinotecano, um quimioterápico muito usado em tratamento de câncer colorretal (Stringer et al., 2007).

Um estudo realizado com ratos portadores de tumores demonstrou após a análise de amostras fecais, que o irinotecano foi capaz de alterar a microbiota intestinal, aumentando os *Clostridium* cluster XI e *Enterobacteriaceae*, particularmente após a terapia em dose intensiva (Lin et al., 2012). Esse aumento de *E. coli* após o tratamento, poderia retomar as bactérias resistentes aos antibióticos, mas novos estudos avaliando os isolados de pacientes antes e depois do tratamento devem ser realizados para elucidar essa e outras questões.

Não houve distinção na produção da neuraminidase (P = 0,818) nem na inibição da atividade da enzima (P = 0,778) entre as cepas de ambas as origens. Os ácidos siálicos

estão amplamente distribuídos na superfície de todas as células eucarióticas para o reconhecimento célula-célula, sendo também alvos para os microrganismos patogênicos (Severi; Hood; Thomas, 2007). As células do câncer são conhecidas por apresentarem um aumento expressivo de ácido siálico em sua superfície, o que confere grandes vantagens às células tumorais (Pearce e Läubli, 2016), que vão desde inibição de apoptose à resistência à terapia do câncer. Sialidases bacterianas ou Neuraminidase, que removem ácidos siálicos de superfície foram usadas na terapia contra o câncer, mas com sucesso limitado (Bull et al., 2014). Em nosso estudo, foi observada uma diferença significativa na produção da enzima neuraminidase nas cepas de ambos os pacientes.

Entretanto, uma aparente relação entre cepas produtoras de neuraminidase e com resistência a drogas foi notada. Considerando as cepas resistentes para estreptomicina e cefalotina, 100% das cepas de CR foram produtoras de neuraminidase e nenhuma cepa de PS produziu a enzima. Ainda, usando a ampicilina, a taxa de produção da enzima em cepas CR subiu para 75% e em cepas PS caiu para 0% após o teste. Com exceção de uma cepa de CR (CR-21), todas as que produziram β-lactamase, também foram positivas para a produção da enzima neuraminidase, enquanto nenhuma das cepas de PS a produziu. A mesma tendência foi observada contra os demais antibióticos que selecionaram cepas produtoras da enzima Neuraminidase, exceto no caso do sulfametoxazol + trimetoprima, que selecionou 33,3% de cepas produtoras em CR e 60% em PS. Embora os ácidos siálicos confiram grandes vantagens às células tumorais e a enzima neuraminidase seja capaz de remover os ácidos siálicos de superfície, o real efeito do uso desses antibióticos em pacientes com CR deve ser mais bem esclarecido.

A α-hemolisina de *E. coli* é uma toxina formadora de poros, que gera pequenos canais permeáveis aos cátions na membrana celular do hospedeiro, induzindo "vazamentos focais", nas células e nos tecidos do cólon, dentro dos quais a *E. coli* hemolítica se acumula (Troeger et al., 2007; Bucker et al., 2014). Halos que indicaram α-hemólise foram visíveis em 1 (6,3%) das cepas de PS e 3 (13%) das cepas de CR (P = 0,492), destacando que todas elas eram ExPEC. Exclusivamente dentre as de CR, duas foram resistentes a 60°C por 30 e 60 minutos.

Em estudo com cepas obtidas de urosepsis e fezes de pacientes sadios, o grupo filogenético B2, altamente virulento, esteve fortemente associado ao abrigo da ilha PKS (associada a aberrações cromossômicas e progressão do CCR) e ao fator citotóxico necrozante (CNF1). Todas as cepas positivas para o CNF1 apresentaram o fenótipo para α-hemólise e, apenas 8% das cepas que apresentaram o fenótipo para α-hemólise foram negativas para CNF1 (Dubois et al., 2010). Outra forte associação entre a α-hemólise e o CCR foi relatado por Jin et al. (2016), que observaram que a *E. coli* α-hemolítica foi significativamente associada ao adenoma e CCR em mulheres, mas não em homens. Em nosso estudo, somente a cepa PS-25 pertenceu ao sexo feminino.

CONCLUSÃO

As cepas avaliadas neste estudo apresentaram uma ampla variedade de características fenotípicas. As cepas isoladas de CR, especialmente, apresentaram característica relacionada à proteção, mas sugere-se maiores estudos dessas características as quais podem apresentar alguma relação com o desenvolvimento do CR.

REFERÊNCIAS

1. Ahonkhai, I; Pugh, W; Russell, A. 1984. Sensitivity to antimicrobial agents of some mercury-sensitive and mercury-resistant strains of Gram-negative bacteria. **Current. Microbiol. 11**: 183-186.

2. Al-Otaibi, F. et al. 2016. Prevalence and risk factors of Gram-negative bacilli causing blood stream infection in patients with malignancy. **Saudi Med. 37**: 979-984.

3. Avila-Campos, M.J. 1995. Haemolytic activity of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strains on different blood types. **Rev.Inst.Med.Trop, 37**:215- 217.

4. Bell, C; Kyriakides, A. 2002. Pathogenic *Escherichia coli*. **Foodborne Path., 10**: 293-320.

5. Booth, S; Johnson, J; Wilkins, T. 1977. Bacteriocin production by strains of Bacteroides isolated from human feces and the role of these strains in the bacterial ecology of the colon. **Antimicrob. Agents Chemother. 11**:718-724

6. Bücker, R. et al. 2014. alpha-Haemolysin of *Escherichia coli* in IBD: a potentiator of inflammatory activity in the colon. **Gut. 63**: 1893-1901.

7. Büll, C. et al. 2014. Sialic acids sweeten a tumor´s life. **Cancer Research. 74**: 3199-3204.

8. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2016. *Performance Standards for AntimicrobialSusceptibility Testing*. 26th ed. CLSI supplement M100S (ISBN 1-56238-923-8)

9. Cuevas-Ramos, G. et al. 2010. *Escherichia coli* induce DNA damage in vivo and triggers genomic instability in mammalian cells. **PNAS. 107**:11537-11542.

10. Dejea, C. et al. 2014. Microbiota organization is a distinct feature of proximal colorectal cancers. **Proc Natl Acad Sci U S A. 51**: 18321-6.

11. Douaiher, J; Ravipati, A; Grams, B; Chowdhury, S; Alatise, O; Are, C. 2017**.** Colorectal cancer-global burden, trends, and geographical variations. **J. Surg. Oncol. 115**: 619–630.

12. Dubois, D. et al. 2010. Cyclomodulins in urosepsis strains of *Escherichia coli*. **J Clin Microbiol. 48**: 2122-29.

13. Fang, S; Fang, X. 2016. Advances in glucose metabolism research in colorectal cancer (Review). **Biomedical Reports. 5**: 289-295.

14. Holdeman, L; Cato, E; Moore, W. 1977. AnaerobicLaboratory.Manual4’ed. **Virginia Polytechnic Institute, Blackburg, VA.**

15. Horne, S. et al. 2016. Spontaneous mutations in the *flhD* operon generate motility heterogeneity in *Escherichia coli* biofilm. **BMC Microbiology. 16:** 262.

16. Jenkins, D; Schultz, J; Martin, A. 1988. Starvation-Induced Cross Protection against Heat or H_2O_2 Challenge in *Escherichia coli*.**J Bacteriol. 170**: 3910-3914.

17. Jin, Y; et al. 2016. Hemolytic *Escherichia coli* Promotes Colonic Tumorigenesis in Females.**Cancer Research. 76**: 2891-2900.

18. Kaper, J; Nataro, J; Mobley, H. 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Rev. 2:**123-140.

19. Kaur, J. et al. 1998. Factors affecting the heat resistance of *Escherichia coli* O157:H7. **Lett Appl Microbiol**. **4**: 325-30

20. Lin, X. et al. 2012. Irinotecan (CPT-11) Chemotherapy Alters Intestinal Microbiota in Tumor Bearing Rats. **PLoS ONE. 7**: e39764.

21. Magalhães, L. et al. 2014. Incidência e perfil de sensibilidade e resistência das estirpes bacterianas isoladas das hemoculturas de um hospital oncológico. **Revista Científica da Faminas. 10**: 40-53.

22. Martin, M. et al. 2004. Enchanced *Escherichia coli* Adherence and Invasion in Crohn´s Disease and Colon Cancer. **Gastroenterol. 127**:80-93.

23. Michaud, A. et al. 2004. High Prevalence of Adherent-Invasive *Escherichia coli* Associated With Ileal Mucosa in Crohn´s Disease. **Gastroenterol.127**: 412-421.

24. Murata, M. et al. 2011. Molecular Strategy for Survival at a Critical High Temperature in *Eschierichia coli.* **PLoS ONE. 6**: e20063.

25. Nascimento, A.; Chartone-Souza, E. 2003. Operon *mer*: Bacterial resistance to mercury and potential for bioremediation of contaminated environments. **Genet. Mol. Res. 2**: 92-101.

26. Pearce, O.; Läubli, H. 2016. Sialic acids in cancer biology and immunity. **Glycobiology, 26:** 111–128

27. Riley, G; Mee, B. 1982. Susceptibility of *Bacteroides*spp. to heavy metals. **Antimicrob. Agents Chemother. 22**: 889-892.

28. Saini, S. et al. 2008. Is a posttranslational activator of FlhD4C2-dependent flagella gene expression? J**. Bacteriol. 190**: 4979–88.

29. Samanta, P. et al. 2013. OmpR and RcsBabolish temporal and spatial changes in expression of flhD in *Escherichia coli* biofilm. **BMC Microbiol. 13**:182.

30. Severi, E.; Hood, D.; Thomas, G. 2007. Sialic acid utilization by bacterial pathogens. **Microbiology, 153**: 2817–2822

31. Silva, M. et al. 2006. Antimicrobial resistance patterns in *Enterobacteriaceae* isolated from urban wastewater treatment plant. **FEMS Microbiol Ecol. 60**: 166-176.

32. Sjöqvist, U. et al. 2005. Colorectal Cancer in Colonic Crohn´s Disease – High Frequency of DNA-Aneuploidy. **Anticancer Res. 25**:4393-4398.

33. Smith, D. 1967. Factors mediate resistance to mercury, nickel, and cobalt. **Science. 156**: 1114-1116.

34. Stewart M.K.; Cookson, B.T. 2014. Mutually repressing repressor functions and multilayeredcellular heterogeneity regulate the bistable Salmonella fliC census. **Mol Microbiol. 94**:1272–84.

35. Stringer, A. et al. 2007. Chemotherapy-induced mucositis: the role of gastrointestinal microflora and mucins in the luminal environment. **J Support Oncol.5**: 259-67.

36. Sutter, V. et al. 1979. Collaborative evaluation of a proposed dilution method of susceptibility testing of anaerobic bacteria. **Antimicrob. Agents Chemother. 16**: 495- 502.

37. Szatrowski, T; Nathan, C. 1991. Production of Large Amounts of Hydrogen Peroxide by Human Tumor Cells. **Cancer Research. 51**: 794-798.

38. Toprak,U. et al. 2006. A possible role of *Bacteroides fragilis* enterotoxin in the aetiology of colorectal cancer. **Clin. Microbiol. Infec. 12**:782-786.

39. Troeger H. et al. 2007. *Escherichia coli* alpha-haemolysin induces focal leaks in colonic epithelium: a novel mechanism of bacterial translocation. **Cell Microbiol. 9**: 2530-2540.

40. Winter, S; Lopez, C; Bäumler, A. 2013. The dynamics of gut-associated microbial communities during inflammation. **EMBO reports. 14**:319-327.

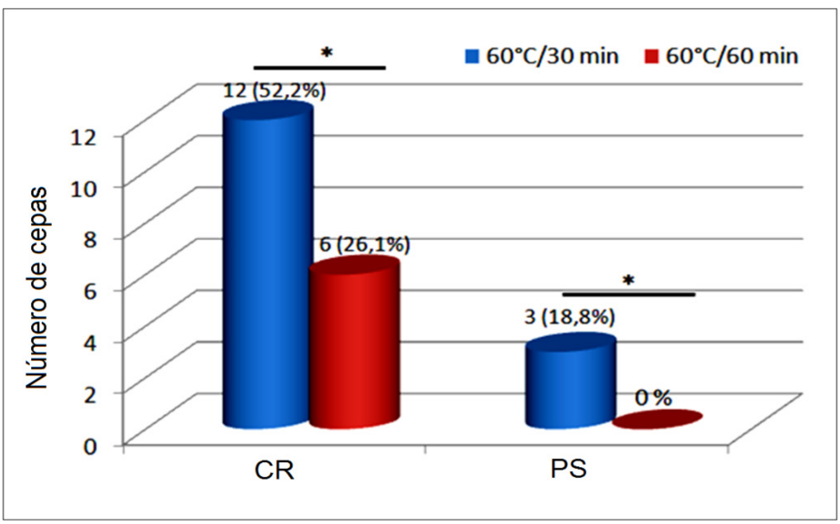


Gráfico 1. Resistência a Temperatura

Antibióticos	CR (n = 23)			PS (n = 16)		
	S	I	R	S	I	R
Ampicilina	15	4	4	9	3	4
Amoxicilina/Ác.Clav	23	0	0	155	1	0
Cefalotina	3	18	2	6	9	1
Cefazolina	23	0	0	15	0	1
Cefotaxima	20	3	0	14	2	0
Cefuroxima	5	18	0	4	12	0
Ceftriaxona	23	0	0	16	0	0
Ceftazidima	21	2	0	15	1	0
Cefepime	20	3	0	15	1	0
Meropenem	22	1	0	16	0	0
Aztreonam	22	1	0	16	0	0
Ácido Nalidixico	22	0	1	16	0	0
Nitrofurantoína	23	0	0	15	0	1
Norfloxacin	23	0	0	16	0	0
Ciprofloxacin	23	0	0	16	0	0
Ofloxacin	23	0	0	16	0	0
Levofloxacin	23	0	0	16	0	0
Estreptomicina	27	4	2	12	2	2
Amicacina	23	0	0	16	0	0
Gentamicina	23	0	0	16	0	0
Azitromicina	22	0	1	14	0	2
Cloranfenicol	23	0	0	15	1	0
Tetraciclina	20	0	3	15	0	1
Sulfametoxazol/Trim	20	0	3	11	0	5
Polimixina	4	17	2	0	15	1

AMP: Ampicilina (14-16), AMC: Amoxicilina/ÁcClav (14-17), CFL: Cefalotina (15-17), CFZ: Cefazolina (>15 <14), CFX: Cefotaxima (23-25), CRX: Cefuroxima (15-22), CRO: Ceftriaxona (20-22), CAZ: Ceftazidima (18-20), CPM: Cefepime (19-24), MER: Meropenem (20-22), AZT: Aztreonam (18-20), NAL: Ácido Nalidixico (14-18), NIT: Nitrofurantoína (15-16), NOR: Norfloxacin (13-16), CIP: Ciprofloxacin (16-20), OFL: Ofloxacin (13-15), LVX: Levofloxacin (14-16), EST: Estreptomicina (12-14), AMI: Amicacina (15-16), GEN: Gentamicina (13-14), AZI: Azitromicina (>13 <12), CLO: Cloranfenicol (13-17), TET: Tetraciclina (12-14), STX: Sulfametoxazol/Trim (11-15), POL B: Polimixina B (12-16), COL: Colistina (<2 >4).

Tabela 1. Susceptibilidade aos antibióticos

Pefil de resistência

Cepas CR		Cepas PS	
1	AMP, CFL, TET	25	AMP
2	POL B	26	AMP
6	STX	28	STX, TET
7	STX	29	$HgCl_2$***, STX
9	$HgCl_2$*	30	$HgCl_2$***, STX
10	$HgCl_2$***, STX, AMP, EST, TET	31	$HgCl_2$*
11	$HgCl_2$*	33	$HgCl_2$*
12	$HgCl_2$*, AZI	35	$HgCl_2$*, AZI
13	$HgCl_2$*, CFL	36	$HgCl_2$*, AMP, CFL, CFZ, EST
14	AMP, EST, POL B	37	$HgCl_2$***, STX, NIT, AZI
15	NAL	38	$HgCl_2$*
16	$HgCl_2$*	39	$HgCl_2$**, STX, AMP, EST, TET, POL B
17	$HgCl_2$*		
18	$HgCl_2$**		
19	$HgCl_2$*		
20	$HgCl_2$*		
21	AMP, TET		
22	$HgCl_2$*		
23	$HgCl_2$*		

AMP: Ampicilina (10 μg), CFL: Cefalotina (30 μg), CFZ: Cefazolina (30 μg), NAL: Ácido Nalidixico (30 μg), NIT: Nitrofurantoína (30 μg), EST: Estreptomicina (10 μg), AZI: Azitromicina (15 μg), TET: Tetraciclina (30 μg), STX: Trimetoprim/Sulfametoxazol (5 μg), POL B: Polimixina B (300 UI), *$HgCl_2$(2 μg/mL), **$HgCl_2$(8 μg/mL), ***$HgCl_2$(16 μg/mL).

Tabela 2. Perfil de resistência a antibióticos e metais pesados.

Cepa produtora de bacteriocina	Cepas Inibidas				Valor de P
	CR		PS		
	(n=23)	(%)	(n=15)	(%)	
CR					
CR 8	8	34.8	2	12,5	0,117
CR 9	8	34.8	2	12,5	0,117
CR 20	15	65,2	9	56,3	0,571
PS					
PS 31	1	4,3	0	0	0,398
PS 34	1	4,3	0	0	0,398
PS 36	19	82,6	11	68,8	0,312

Chi-Square test (α = 95%; $P < 0,05$).

Tabela 3. Produção de Bacteriocinas.

CAPÍTULO 3

OBESIDADE POLIGÊNICA: DESVENDANDO AS BASES GENÉTICAS

Data de submissão: 06/6/2023 *Data de aceite: 03/07/2023*

Raisa da Silva Martins
Universidade Grande Rio
Duque de Caxias - RJ
https://lattes.cnpq.br/0308764486906582

Izadora Sthephanie da Silva Assis
Instituto Oswaldo Cruz
Rio de Janeiro – RJ
http://lattes.cnpq.br/5561428680836176

Ana Carolina Proença da Fonseca
Instituto Oswaldo Cruz
Rio de Janeiro – RJ
http://lattes.cnpq.br/1794323070101460

RESUMO: A obesidade poligênica é uma doença multifatorial que ocorre devido a uma disfunção crônica do balanço energético causando um desequilíbrio constante entre o consumo de alimento e o gasto de energia. Estima-se que atualmente existem, no mundo, mais de um bilhão de obesos. O reconhecimento de uma base genética para a obesidade humana tem direcionado a identificação de genes que atuam em rotas que participam da homeostase energética, controle de massa corporal e deposição de gordura em humanos. Desta forma já foi possível identificar variantes em genes que predispõe um aumento no IMC, afetam o consumo alimentar e outras medidas antropométricas. Este capítulo visa abordar as características da doença, a principal via de regulação energética e a genética subjacente à predisposição da obesidade poligênica, bem como futuras perspectivas.

PALAVRAS-CHAVE: Obesidade poligênica; Via leptina-melanocortina; IMC; Variantes genéticas.

ABSTRACT: Polygenic obesity is a multifactorial disease that occurs due to a chronic dysfunction of energy balance caused by a prolonged imbalance between food intake and energy expenditure. Currently, it is estimated that there are more than one billion individuals with obesity in the world. Different studies of genetic basis for human obesity led the identification of candidate genes for this disease, which acts on energy homeostasis, body mass control and fat deposition. Thus, it has been possible to identify genetic variants that predispose to increased BMI, affect food consumption and other anthropometric measures. In this context, the present study aims to introduce the obesity characteristics, the main pathway

of energy regulation and the genetics underlying the predisposition to polygenic obesity, as well as future perspectives.
KEYWORDS: Polygenic obesity; Leptin-melanocortin pathway; BMI; Genetic variations.

INTRODUÇÃO

A obesidade é uma doença crônica de grande impacto na saúde pública e um desafio mundial. A doença é caracterizada por um de balanço energético positivo, onde a energia ingerida excede a energia que é utilizada, ocorrendo assim um acúmulo anormal ou excessivo de gordura que pode comprometer a saúde (CUMMINGS et al., 2003; WHO, 2022). Atualmente, no mundo, existem mais de um bilhão de indivíduos com obesidade, sendo 650 milhões de adultos, 340 milhões de adolescentes e 39 milhões de crianças (menores que 5 anos). Ainda se estima que até 2025 aproximadamente 167 milhões de pessoas se terão obesidade ou estarão com sobrepeso (WHO, 2022). Só no Brasil, em 2022, mais de 6,7 milhões de pessoas desenvolveram essa doença (SISVAN, 2023).

O aumento do peso corporal eleva o risco de muitas doenças crônicas, como hipertensão arterial sistêmica, doenças cardiovasculares, diabetes mellitus tipo 2, dislipidemia, osteoartrite e alguns tipos de câncer (SWINBURN et al., 2011; GBD et al., 2017). Recentemente foi observado que a obesidade é um fator de risco para COVID-19 e que esses indivíduos têm maior risco de hospitalização e de apresentarem sintomas mais graves da doença (ZHAO et al., 2020).

Registros históricos mostram que a obesidade é ancestral e que surgiu antes mesmo do desenvolvimento da agricultura e em todas as culturas. Com a elevação das classes sociais, resultando em melhora nas condições de vida, um aumento do tempo ocioso e uma maior oferta e acesso aos alimentos calóricos, culminou no aumento da prevalência da obesidade mundialmente (Bray, 2014). Contudo, em tempos bem primitivos, considera-se que o acúmulo de gordura era vantajoso, pois o alimento era menos disponível e a atividade física era intensa (XIA; GRANT, 2013). No entanto, não somente as condições ambientais são suficientes para o desenvolvimento da doença, é evidente que há um importante componente genético subjacente ao risco de desenvolvimento do fenótipo obeso, como apontado em diversos estudos com famílias, irmãos gêmeos e indivíduos adotados (STUNKARD et al., 1986; ALLISON et al., 1996; RICE et al., 1999; COADY et al., 2002). Notou-se também que a influência da genética na obesidade chega a variar de 40 a 70 % no índice de massa corporal (IMC) dos indivíduos (SHULDINER; MUNIR, 2003). Assim, podemos caracterizar a doença como um fenótipo que resulta da interação de fatores endógenos e exógenos.

Geneticamente a obesidade pode ser classificada em duas categorias: monogênica e poligênica. A obesidade monogênica, uma forma mais rara, onde a presença de uma mutação em um único gene é o suficiente para desencadear a doença. Essa obesidade

monogênica apresenta dois subtipos: a sindrômica e a não sindrômica. (FAROOQI; O'RAHILLY, 2005). Na obesidade monogênica não sindrômica a maioria dos genes envolvidos codificam proteínas que participam de uma via central presente no hipotálamo, a via de sinalização leptina-melanocortina, afetando a regulação do consumo de comida e gasto de energia basal (FAROOQI; O'RAHILLY, 2008). As formas sindrômicas ocorrem associadas a outras características, como deficiência intelectual ou o desenvolvimento anormal de um órgão específico. No total, mais de 30 desordens mendelianas resultam em obesidade síndrômica, como Bardet-Bield, Altrön e Cohen (ALBUQUERQUE et al., 2015). Os primeiros genes descobertos envolvidos na obesidade monogênica ocorreram a partir de estudos de caso entre famílias com fenótipos extremos de obesidade. A maior parte dos genes envolvidos codificam proteínas participantes da via de sinalização leptina-melanocortina no hipotálamo (FAROOQI; O'RAHILLY, 2008).

Já a segunda categoria, obesidade poligênica, é a forma mais comum da doença, caracterizada por ser influenciada por diversos *loci* gênicos, no qual muitas das variantes contribuem com um pequeno efeito cumulativo na predisposição à doença e com variação entre os indivíduos. O efeito dessas variantes somado a um ambiente obesogênico, resultaria em um fenótipo de obesidade no indivíduo. (LOOS; YEO, 2022). Nesta forma de obesidade, diversos são os genes candidatos, que podem estar envolvidos na predisposição e progressão. Esses genes podem estar envolvidos em vias da homeostase energética e termogênese, adipogênese, sinalização hormonal, dentre outros (LOKTIONOV, 2003; DEN HOED; LOOS; 2014).

Mais recentemente novas tecnologias emergiram possibilitando a ampliação do número de genes candidatos. Os estudos de associação ampla do genoma (*Genome Wide Association Studies* – GWAS) testam a associação genótipo/fenótipo por meio de mais 4,8 milhões de marcadores genéticos em todo o genoma. Essa metodologia tem sido utilizada para a identificação de variantes comuns (MAF>1%) em doenças complexas (Yazdi; Clee; Meyre; 2015). O primeiro estudo de GWAS sobre obesidade descobriu algumas variantes comuns no primeiro íntron do gene *FTO* e que foram fortemente associadas ao IMC (FRAYLING et al., 2007; SCUTERI et al., 2007). Outra recente tecnologia que tem auxiliado a pesquisa genômica é o sequenciamento de nova geração (*Next Generation Sequencing* – NGS), baseando em análises de todo o genoma ou somente das porções codificadoras (exoma). Atualmente, por meio do GWAS, foi verificado a existência de mais de 120 sítios ligados com a obesidade (SINGH; KUMAR; MAHALINGAM; 2017) e por NGS verificou-se mais de 500 genes relacionados a obesidade. Dentre os genes associados à obesidade, as pesquisas apontam o que atuam na via leptina-melanocortina como fortes candidatos (LOOS; YEO; 2022).

VIA LEPTINA-MELANOCORTINA

A via leptina-melanocortina possui uma estrutura complexa de regulação neuroendócrina através de três pilares: estômago, cérebro e tecido adiposo. Neste sentido, o hipotálamo é o centro integrador dos sinais periféricos oriundos do status energético do corpo, e comanda comportamentos para ingestão alimentar e o gasto energético.

Quando o estoque de gordura corporal está aumentado e não há a necessidade de ingestão de mais alimentos, o hormônio leptina é secretado pelo tecido adiposo, que percorre a corrente sanguínea e atravessa a barreira hematoencefálica levando essa informação ao hipotálamo. No núcleo arqueado do hipotálamo, a leptina se liga ao seu receptor (LEPR) na superfície do grupo de neurônios orexígenos AgRP/Npy, inibindo a liberação da proteína agouti-relacionados e neuropeptídeo Y. A leptina também vai se ligar em seu receptor na superfície dos neurônios anorexígenos que estimulam o conjunto de neuropeptídeos Pró-Opiomelanocortina (POMC) e transcritos relacionados à anfetamina e cocaína (CART). Ambos os grupos de neurônios POMC/Cart e AgRP/Npy possuem seus corpos celulares presentes no núcleo arqueado do hipotálamo, porém seus axônios se projetam para o núcleo paraventricular (PVN).

Na ação da leptina os neurônios AGRP/NPY se projetam para além do núcleo paraventricular onde o conjunto POMC/Cart promove a síntese o hormônio α-MSH (Hormônio estimulante de alfa-melanócitos) que atua em receptores de melanocortina (MC4R) - estabilizando-o em uma conformação ativa. Essa ativação resulta na potencialização do sinal de saciedade e por consequência na diminuição da ingestão de alimentos e no aumento do gasto energético basal (Farooqi & O'Rahilly, 2008; Damiani, Damiani, 2011; Albuquerque et al., 2015; Baldini; Phelan; 2019; Kharbanda; Bansal; Aneja; 2022).

Em momentos de jejum ou diminuição energética, a circulação de leptina é diminuída e há liberação do hormônio grelina pelas células oxínticas da mucosa estomacal. Ao ultrapassar a barreira hematoencefálica, a grelina se liga em seus receptores (GHSR) na superfície dos neurônios orexígenos no núcleo arqueado do hipotálamo e estimula a síntese dos neuropeptídeos AgRP e NPY. No PVN, o AGRP age como antagonista endógeno de MC4R para induzir a ingestão alimentar. Todo esse conjunto atua como um sistema de controle de inibição e ingestão alimentar, realizando a regulação do balanço energético. (Baldini; Phelan; 2019; Kharbanda; Bansal; Aneja; 2022) (**Figura 1**).

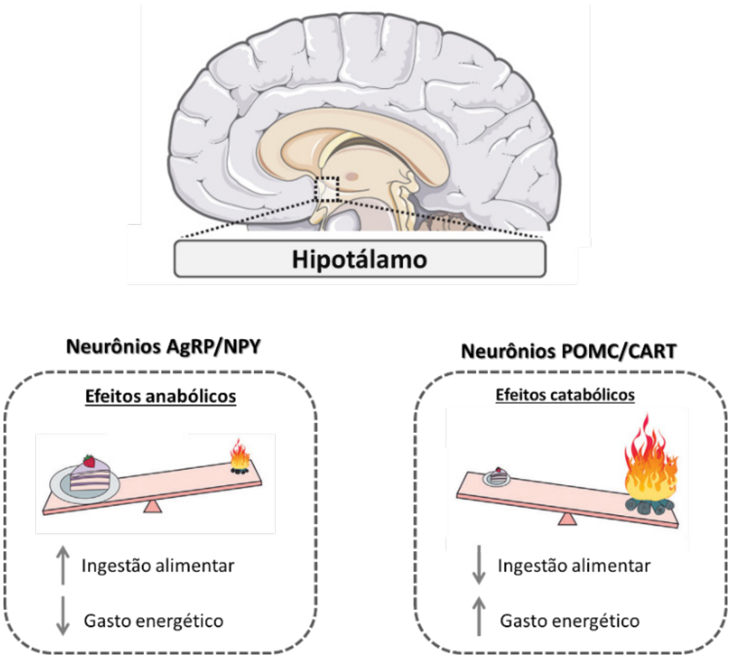


Figura 1: Via leptina-melanocortina e sua atuação no balanço energético.

Genes e variantes da via leptina-melanocortina

Os polimorfismos de genes envolvidos na via da leptina-melanocortina são alvos de diversos estudos, pois além de estarem envolvidos na forma monogênica da doença, também já mostraram estar envolvidos na predisposição da obesidade poligênica ou suas comorbidades em diferentes países (Stutzmann et al., 2009; Loos et al., 2008; Chambers et al., 2008) e no Brasil (Mattevi et al., 2002; Fernandes et al., 2015; DA FONSECA et al., 2019).

Gene LEP

A leptina é um hormônio de peso molecular de 16 KD codificado pelo gene *LEP,* localizado no locus 7q31.2 (ZHANG et al., 1997). Esse hormônio é produzido predominantemente pelo tecido adiposo branco e secretado proporcionalmente à massa tecidual (BARBOSA et al., 2010; OBRADOVIC et al., 2021). Em casos de paciente com obesidade, sabe-se que os níveis séricos de leptina tendem a ser altos, e ocorre o desenvolvimento de resistência a esse hormônio.

Na literatura, estudos relatam que variações no gene *LEP* podem afetar a expressão de leptina (SOCOL et al., 2022; OBRADOVIC et al., 2021). Por exemplo, o rs7799039 tem sido associado ao aumento dos níveis circulantes desse hormônio (HINUY et al., 2008; JIMÉNEZ-OSORIO et al., 2019). Recentemente, um estudo com uma coorte de mestiços

mexicanos relatou que o polimorfismo rs7799039 estava associado ao aumento dos níveis séricos de leptina. Eles também observaram que o alelo mutado (A) era um fator de proteção ao desenvolvimento de diabetes *mellitus* tipo 2 (JIMÉNEZ-OSORIO et al., 2019). No Brasil, um estudo observou que a presença do alelo mutado estava associado aos maiores níveis desse hormônio em crianças e adolescentes com obesidade (MENEZES et al., 2022).

Com relação ao risco a obesidade, um estudo na Tunísia mostrou que a variante rs7799039 apresenta uma diferença significante entre grupos com diferentes níveis de adiposidade (ZAYANI et al., 2017). No Brasil, esse polimorfismo foi associado ao ganho de peso excessivo durante a gravidez (Martins et al., 2017).

Gene LEPR

O receptor de leptina (LEPR) é uma proteína transmembranar, membro da família receptora de citocinas. Este receptor é codificado pelo gene *LEPR*, localizado no lócus 1p31 (FAIRBROTHER et al., 2018). Através do encadeamento alternativo, essa proteína possui 6 isoformas que se diferenciam na porção c terminal e no comprimento (SAEED et al., 2014; HOUSEKNECHT; PORTOCARRERO, 1998). Ademais, essas isoformas são expressas em diversos tecidos, sendo a isoforma OB-R majoritariamente expressa no hipotálamo (FAIRBROTHER et al., 2018; FRIEDMAN; HALAAS, 1998; (HOUSEKNECHT; PORTOCARRERO, 1998). Nessa região os receptores de leptina agem em resposta a ligação da leptina, excitando os neurônios anorexígenos (CART/POMC) através da ativação da via JAK-STAT (HOMMEL et al., 2006). Essa ligação propicia na regulação da homeostase energética, através de mecanismos que impactam na saciedade e no apetite.

Alterações na sequência do gene *LEPR* podem resultar em uma proteína incapaz de reconhecer a leptina, acarretando no aumento dos níveis séricos desse hormônio e no desenvolvimento de obesidade (SAEED et al., 2014). Na literatura, evidências robustas já mostraram o envolvimento do polimorfismo rs1137101 na predisposição a diabetes mellitus tipo II, uma comorbidade da obesidade (YANG et al., 2016). Esse mesmo polimorfismo já foi associado ao IMC em norte americanos e em brasileiros (GALLICCHIO *et al.,* 2009; OLIVEIRA *et al.,* 2013). Estudos prévios com uma população italiana relataram que a presença do alelo raro (G) foi um fator de risco para o desenvolvimento de obesidade (RICCI et al., 2021). Resultados similares foram observados em uma coorte ascendência caucasiana. Nesse estudo, eles também observaram que a presença do alelo mutado (G) contribuía para o aumento dos níveis séricos de leptina e da circunferência da cintura, sendo os indivíduos homozigotos GG com o maior risco para obesidade (OLIVEIRA et al., 2013).

Gene POMC

A proopiomelanocortina é uma proteína precursora codificada pelo gene *POMC,* localizado no lócus 2p23.3. O processamento dessa proteína leva a produção de hormônios estimulantes de melanócitos (MSHs), corticotropina (ACTH) e β-endorfina (MILLINGTON, 2006). Além disso, essa proteína se encontra abundantemente expressa no núcleo arqueado, mas pode ser encontrada na hipófise e na pele (MILLINGTON, 2007). No hipotálamo, a interação da leptina com seu receptor resulta no aumento da expressão de POMC (NEGRÃO; LICINIO, 2000). Posteriormente a sequência desse peptídeo é processada através da enzima pró-hormônio convertase que leva a formação dos hormônios estimulantes de melanócitos (MSHs). O α-MSH interage com receptores de melanocortina 3 e 4, que por sua vez, agem na modulação do gasto energético e na ingestão alimentar (RODRIGUES; SUPLICY; RADOMINSKI, 2003).

Alguns estudos relatam que variações na sequência do gene *POMC* podem levar ao mal processamento dessa proteína e resultar no desenvolvimento de obesidade precoce (KRUDE; BIEBERMANN; GRUTERS, 2003; SRIVASTAVA et al., 2014). Dentre as variantes identificadas nesse gene, a rs1042571 vem sendo associada a forma poligênica da doença. Um estudo realizado com uma população homogênea do norte da Índia mostrou um maior risco para obesidade naqueles indivíduos carreadores do alelo mutado (T). No entanto, nenhuma associação foi observada em uma coorte tailandesa (KULANUWAT et al., 2015).

Gene MC4R

O receptor de melanocortina 4 é uma proteína pertencente à classe de receptores acoplados à proteína G (GPCR), codificado pelo gene MC4R -localizado no lócus 18q21.3. Essa proteína pode ser encontrada em diversas regiões cerebrais, como: tálamo, córtex, medula espinhal, tronco cerebral e hipotálamo (GANTZ et al., 1993; MOUNTJOY et al., 1994; SUNDARAMURTHY et al., 1998). Na via anorexígena, o hormônio estimulante de α-MSH, gerado do processamento de POMC, se liga ao MC4R e o ativa. Essa ligação promove um sinal de saciedade e aumento do gasto energético basal. Em contrapartida, a ligação do antagonista, denominado AgRP, inibe a sinalização do MC4R e estimula o apetite e a diminuição o gasto energético (FANI et al., 2014; BARSH; FAROOQI; O'RAHILLY, 2000).

Diversos estudos na literatura têm mostrado que alterações genéticas no gene *MC4R* ou proximais a ele, podem gerar uma proteína truncada ou com perda de função. Estas alterações podem acarretar no desenvolvimento de formas graves de obesidade e hiperfagia (FAIRBROTHER et al., 2018; FLIER, 2004; VAISSE et al., 1998). Um dos polimorfismos que tem sido associado ao desenvolvimento de obesidade é o rs17782313. Em estudo com uma coorte kuwaitiana foi observado que o alelo mutado (C) estava associado à obesidade, hipertensão arterial sistêmica e altos níveis de grelina (HAMMAD

et al., 2020). Já em paquistaneses foi observado uma associação à sobrepeso/apenas em mulheres. (RANA et al, 2018). Por fim, a avaliação desse polimorfismo no Norte da Índia mostrou que o genótipo CC estava significativamente associado ao desenvolvimento desta doença (SRIVASTAVA et al., 2014).

Gene FTO

O gene da massa gorda associado à obesidade (FTO), localizado no 16q12.2, codifica uma proteína desmetilase com 505 aminoácidos. Esta proteína é no tecido adiposo, músculos esqueléticos e em núcleos hipotalâmicos que regulam o balanço energético (LAN et al., 2020; GERKEN et al., 2007). O mecanismo de atuação dessa proteína ainda não está totalmente elucidado, mas já foi descrito que regula a expressão gênica através da demetilação do DNA. Além disso, esta proteína está envolvida em reparo do DNA e no metabolismo de ácido graxos (GERKEN et al., 2007; LIU et al., 2019; WU et al., 2010).

Em estudos de GWAs foi relatado que alterações genéticas no gene FTO estão associadas a desenvolvimento de obesidade (SCUTERI et al., 2007; KIM et al., 2016; FRAYLING et al., 2007). Um polimorfismo que tem sido associado a obesidade é o rs9939609. Em um estudo com uma coorte russa foi observado uma inter-relação entre esse polimorfismo e a obesidade (ALI et al., 2021). Já em crianças do Reino Unido, a presença do alelo mutado (A) estava associada à obesidade e o genótipo AA indicou alteração na sensação de saciedade (WARDLE et al., 2008). No entanto, não foi visto uma correlação entre esse polimorfismo e a obesidade em uma coorte de crianças e adolescentes egípcias, brasileiras e mexicanas (ABDELMAJED et al., 2017; PEREIRA et al., 2016; LEÓN-MIMILA et al., 2013).

CONCLUSÃO

A obesidade comum, encontrada na maior parte dos casos, é uma doença poligênica e multifatorial. Por ser uma doença complexa, tem sido um grande desafio o uso da genética como instrumento de predição de risco e prevenção. Neste sentido, os esforços atuais estão se concentrando no desenvolvimento de escore poligênico para previsão da obesidade a partir dos GWAS realizados. Recentemente, um modelo utilizou 2,1 milhões de variantes comuns (que corresponde a 8,4% da variação do IMC) a fim de quantificar a susceptibilidade a doença em um conjunto amostral de 300.000 indivíduos. Esse escore mostrou um desempenho preditivo interessante, onde indivíduos com maiores escores tem 4,2 vezes mais chances de desenvolver obesidade do que os indivíduos que tiveram menor pontuação (KHERA et al., 2019). Assim, cada vez mais novas tecnologias e métodos estão sendo criados, o que nos aproxima da tão sonhada medicina de precisão para a obesidade.

REFERÊNCIAS

ABDELMAJED, S. S. et al. Association analysis of FTO gene polymorphisms and obesity risk among Egyptian children and adolescents. **Genes & Diseases**, v. 4, n. 3, p. 170–175, 4 jul. 2017.

ALBUQUERQUE, David et al. Current review of genetics of human obesity: from molecular mechanisms to an evolutionary perspective. **Molecular genetics and genomics**, v. 290, p. 1191-1221, 2015.

ALI, A. H. A. et al. The association between the genes LPL Ser447Ter, CMA1-1903A > G, FTO rs9939609 and obesity in the Rostov region from Russia. **Gene Reports**, v. 25, p. 101324, 1 dez. 2021.

ALLISON, David B. et al. The heritability of body mass index among an international sample of monozygotic twins reared apart. **International journal of obesity and related metabolic disorders: journal of the International Association for the Study of Obesity**, v. 20, n. 6, p. 501-506, 1996.

BALDINI, Giulia; PHELAN, Kevin D. The melanocortin pathway and control of appetite-progress and therapeutic implications. **The Journal of endocrinology**, v. 241, n. 1, p. R1, 2019.

BARBOSA, K. B. F. et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v. 23, p. 629–643, ago. 2010.

BARSH, G. S.; FAROOQI, I. S.; O'RAHILLY, S. Genetics of body-weight regulation. **Nature**, v. 404, n. 6778, p. 644–651, abr. 2000.

BRAY, G. A. Obesity has always been with us. A historical introduction. **Handbook of Obesity**, v. 1, p. 3-17, 2014.

CLEMENT, Karine et al. A mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction. **Nature**, v. 392, n. 6674, p. 398-401, 1998.

COADY, Sean A. et al. Genetic variability of adult body mass index: a longitudinal assessment in Framingham families**. Obesity research**, v. 10, n. 7, p. 675-681, 2002.

CUMMINGS, David E.; SCHWARTZ, Michael W. Genetics and pathophysiology of human obesity. **Annual review of medicine**, v. 54, n. 1, p. 453-471, 2003.

DA FONSECA, Ana Carolina Proenca et al. Identification of the MC4R start lost mutation in a morbidly obese Brazilian patient. **Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy**, p. 257-266, 2019.

DAMIANI, Daniel; DAMIANI, Durval. Sinalização cerebral do apetite. **Rev Bras Clin Med**, v. 9, n. 2, p. 138-45, 2011.

FAIRBROTHER, U. et al. Genetics of Severe Obesity. **Current Diabetes Reports**, v. 18, n. 10, p. 85, 18 ago. 2018.

FAIRBROTHER, U. et al. Genetics of Severe Obesity. **Current Diabetes Reports**, v. 18, n. 10, p. 85, 2018.

FANI, L. et al. The melanocortin-4 receptor as target for obesity treatment: a systematic review of emerging pharmacological therapeutic options. **International Journal of Obesity**, v. 38, n. 2, p. 163–169, fev. 2014.

FAROOQI, I. Sadaf et al. Clinical and molecular genetic spectrum of congenital deficiency of the leptin receptor**. New England Journal of Medicine**, v. 356, n. 3, p. 237-247, 2007.

FAROOQI, I. Sadaf; O'RAHILLY, Stephen. Monogenic obesity in humans. **Annu. Rev. Med.**, v. 56, p. 443-458, 2005.

FAROOQI, I. Sadaf; O'RAHILLY, Stephen. Mutations in ligands and receptors of the leptin–melanocortin pathway that lead to obesity. **Nature clinical practice Endocrinology & metabolism**, v. 4, n. 10, p. 569-577, 2008.

FERNANDES, Ariana Ester et al. Associations between a common variant near the MC4R gene and serum triglyceride levels in an obese pediatric cohort. **Endocrine**, v. 49, p. 653-658, 2015.

FLIER, J. S. Obesity Wars: Molecular Progress Confronts an Expanding Epidemic. **Cell**, v. 116, n. 2, p. 337–350, 23 jan. 2004.

FRAYLING, T. M. et al. A Common Variant in the FTO Gene Is Associated with Body Mass Index and Predisposes to Childhood and Adult Obesity. **Science (New York, N.Y.)**, v. 316, n. 5826, p. 889–894, 11 maio 2007.

FRAYLING, Timothy M. et al. A common variant in the FTO gene is associated with body mass index and predisposes to childhood and adult obesity. **Science**, v. 316, n. 5826, p. 889-894, 2007.

FRIEDMAN, J. M.; HALAAS, J. L. Leptin and the regulation of body weight in mammals. **Nature**, v. 395, n. 6704, p. 763–770, out. 1998.

GALLICCHIO, Lisa et al. Single nucleotide polymorphisms in obesity-related genes and all-cause and cause-specific mortality: a prospective cohort study. **BMC medical genetics**, v. 10, n. 1, p. 1-9, 2009.

GANTZ, I.; MIWA, H.; KONDA, Y.; *et al*. Molecular cloning, expression, and gene localization of a fourth melanocortin receptor. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 20, p. 15174–15179, 1993.

GBD 2015 OBESITY COLLABORATORS. Health effects of overweight and obesity in 195 countries over 25 years. **New England journal of medicine**, v. 377, n. 1, p. 13-27, 2017.

GERKEN, T. et al. The Obesity-Associated FTO Gene Encodes a 2-Oxoglutarate–Dependent Nucleic Acid Demethylase. **Science (New York, N.Y.)**, v. 318, n. 5855, p. 1469–1472, 30 nov. 2007.

HAMMAD, M. M. et al. MC4R Variant rs17782313 Associates With Increased Levels of DNAJC27, Ghrelin, and Visfatin and Correlates With Obesity and Hypertension in a Kuwaiti Cohort. **Frontiers in Endocrinology**, v. 11, p. 437, 7 jul. 2020.

HINUY, H. M. et al. Leptin G-2548A promoter polymorphism is associated with increased plasma leptin and BMI in Brazilian women. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 52, n. 4, p. 611–616, jun. 2008.

HOMMEL, J. D. et al. Leptin Receptor Signaling in Midbrain Dopamine Neurons Regulates Feeding. **Neuron**, v. 51, n. 6, p. 801–810, 21 set. 2006.

HOUSEKNECHT, K. L.; PORTOCARRERO, C. P. Leptin and its receptors: regulators of whole-body energy homeostasis. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 15, n. 6, p. 457–475, 1 nov. 1998.

JIMÉNEZ-OSORIO, A. et al. Common Polymorphisms Linked to Obesity and Cardiovascular Disease in Europeans and Asians are Associated with Type 2 Diabetes in Mexican Mestizos. **Medicina**, v. 55, p. 8, 5 fev. 2019.

KHARBANDA, Charu; BANSAL, Savita; ANEJA, Prachi Saffar. Role and significance of ghrelin and leptin in hunger, satiety, and energy homeostasis. **Journal of the Scientific Society**, v. 49, n. 1, p. 12-16, 2022.

KHERA, Amit V. et al. Polygenic prediction of weight and obesity trajectories from birth to adulthood. **Cell**, v. 177, n. 3, p. 587-596. e9, 2019.

KIM, Y.-J. et al. Association of Metabolites with Obesity and Type 2 Diabetes Based on FTO Genotype. **PLoS ONE**, v. 11, n. 6, p. e0156612, 1 jun. 2016.

KRUDE, H.; BIEBERMANN, H.; GRUTERS, A. Mutations in the human proopiomelanocortin gene. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 994, p. 233–239, jun. 2003.

KULANUWAT, S. et al. Association between rs155971 in the PCSK1 gene and the lipid profile of obese Thai children: a family-based study. **Genetics and molecular research: GMR**, v. 14, n. 3, p. 9136–9144, 7 ago. 2015.

LAN, N. et al. FTO – A Common Genetic Basis for Obesity and Cancer. **Frontiers in Genetics**, v. 11, p. 559138, 16 nov. 2020.

LEÓN-MIMILA, P. et al. Contribution of Common Genetic Variants to Obesity and Obesity-Related Traits in Mexican Children and Adults. **PLoS ONE**, v. 8, n. 8, p. e70640, 8 ago. 2013.

LIU, S.-J. et al. FTO is a transcriptional repressor to auto-regulate its own gene and potentially associated with homeostasis of body weight. **Journal of Molecular Cell Biology**, v. 11, n. 2, p. 118, fev. 2019.

LOKTIONOV, Alexandre. Common gene polymorphisms and nutrition: emerging links with pathogenesis of multifactorial chronic diseases. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 14, n. 8, p. 426-451, 2003.

LOOS, Ruth JF et al. Common variants near MC4R are associated with fat mass, weight and risk of obesity. **Nature genetics**, v. 40, n. 6, p. 768-775, 2008.

LOOS, Ruth JF; YEO, Giles SH. The genetics of obesity: from discovery to biology. **Nature Reviews Genetics**, v. 23, n. 2, p. 120-133, 2022.

Marcel den Hoed and Ruth J. F. Loos. Genes and the predisposition to obesity. (2015) In: BRAY, George A. (Ed.). Handbook of Obesity--Volume 1: Epidemiology, Etiology, and Physiopathology. **CRC Press**, 2014.

MARTINS, Maisa Cruz et al. Polymorphisms in the leptin (rs7799039) gene are associated with an increased risk of excessive gestational weight gain but not with leptin concentration during pregnancy. **Nutrition Research**, v. 47, p. 53-62, 2017.

MATTEVI, V. S.; ZEMBRZUSKI, V. M.; HUTZ, M. H. Association analysis of genes involved in the leptin-signaling pathway with obesity in Brazil**. International journal of obesity**, v. 26, n. 9, p. 1179-1185, 2002.

MENEZES, C. A. et al. Genetic polymorphisms and plasma concentrations of leptin (rs7799039) and adiponectin (rs17300539) are associated with obesity in children and adolescents. **Revista Paulista De Pediatria: Orgao Oficial Da Sociedade De Pediatria De Sao Paulo**, v. 40, p. e2021030, 2022.

MILLINGTON, G. W. M. Proopiomelanocortin (POMC): the cutaneous roles of its melanocortin products and receptors. **Clinical and Experimental Dermatology**, v. 31, n. 3, p. 407–412, may 2006.

MILLINGTON, G. W. The role of proopiomelanocortin (POMC) neurones in feeding behaviour. **Nutrition & Metabolism**, v. 4, p. 18, 1 set. 2007.

MONTAGUE, Carl T. et al. Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. **Nature**, v. 387, n. 6636, p. 903-908, 1997.

MOUNTJOY, K. G.; MORTRUD, M. T.; LOW, M. J.; *et al*. Localization of the melanocortin-4 receptor (MC4-R) in neuroendocrine and autonomic control circuits in the brain. **Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)**, v. 8, n. 10, p. 1298–1308, 1994.

NEGRÃO, A. B.; LICINIO, J. Leptina: o diálogo entre adipócitos e neurônios. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 44, n. 3, p. 205–214, jun. 2000.

OBRADOVIC, M. et al. Leptin and Obesity: Role and Clinical Implication. **Frontiers in Endocrinology**, v. 12, 2021.

OLIVEIRA, R. DE et al. Leptin receptor gene polymorphisms are associated with adiposity and metabolic alterations in Brazilian individuals. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 57, p. 677–684, dez. 2013.

OLIVEIRA, Raquel de et al. Leptin receptor gene polymorphisms are associated with adiposity and metabolic alterations in Brazilian individuals. **Arquivos Brasileiros de endocrinologia & metabologia**, v. 57, p. 677-684, 2013.

PEREIRA, P. DE A. et al. Lack of association between genetic polymorphism of FTO, AKT1 and AKTIP in childhood overweight and obesity. **Jornal de Pediatria (Versão em Português)**, v. 92, n. 5, p. 521–527, 1 set. 2016.

RANA, S.; RAHMANI, S.; MIRZA, S. MC4R variant rs17782313 and manifestation of obese phenotype in Pakistani females. **RSC Advances**, v. 8, n. 30, p. 16957–16972, 2018.

RICCI, C. et al. The impact of CPT1B rs470117, LEPR rs1137101 and BDNF rs6265 polymorphisms on the risk of developing obesity in an Italian population. **Obesity research & clinical practice**, v. 15, n. 4, p. 327–333, 1 jul. 2021.

RICE, Treva et al. Familial aggregation of body mass index and subcutaneous fat measures in the longitudinal Quebec family study. **Genetic Epidemiology: The Official Publication of the International Genetic Epidemiology Society**, v. 16, n. 3, p. 316-334, 1999.

RODRIGUES, A. M.; SUPLICY, H. L.; RADOMINSKI, R. B. Controle neuroendócrino do peso corporal: implicações na gênese da obesidade. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 47, p. 398–409, ago. 2003.

SAEED, S. et al. Novel LEPR mutations in obese Pakistani children identified by PCR-based enrichment and next generation sequencing. **Obesity**, v. 22, n. 4, p. 1112–1117, 2014.

SCUTERI, A. et al. Genome-Wide Association Scan Shows Genetic Variants in the FTO Gene Are Associated with Obesity-Related Traits. **PLoS Genetics**, v. 3, n. 7, p. e115, jul. 2007.

SCUTERI, Angelo et al. Genome-wide association scan shows genetic variants in the FTO gene are associated with obesity-related traits. **PLoS genetics**, v. 3, n. 7, p. e115, 2007.

SHULDINER, Alan R.; MUNIR, Kashif M. Genetics of obesity: more complicated than initially thought. **Lipids**, v. 38, n. 2, p. 97-101, 2003.

SINGH, Rajan Kumar; KUMAR, Permendra; MAHALINGAM, Kulandaivelu. Molecular genetics of human obesity: A comprehensive review. **Comptes rendus biologies**, v. 340, n. 2, p. 87-108, 2017.

SISVAN. **Relatórios de Acesso público**. Disponível em: <https://sisaps.saude.gov.br/sisvan/relatoriopublico/index>.Acesso em: 29 de maio de 2023.

SOCOL, C. T. et al. Leptin Signaling in Obesity and Colorectal Cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 9, p. 4713, 24 abr. 2022.

SRIVASTAVA, A. et al. Evaluation of MC4R [rs17782313, rs17700633], AGRP [rs3412352] and POMC [rs1042571] Polymorphisms with Obesity in Northern India. **Oman Medical Journal**, v. 29, n. 2, p. 114–118, mar. 2014.

SRIVASTAVA, Apurva; MITTAL, Balraj; PRAKASH, Jai; *et al*. Evaluation of MC4R [rs17782313, rs17700633], AGRP [rs3412352] and POMC [rs1042571] Polymorphisms with Obesity in Northern India. **Oman Medical Journal**, v. 29, n. 2, p. 114–118, 2014.

STUNKARD, Albert J. et al. An adoption study of human obesity. **New England Journal of Medicine**, v. 314, n. 4, p. 193-198, 1986.

STUTZMANN, F. et al. Common genetic variation near MC4R is associated with eating behaviour patterns in European populations. **International journal of obesity**, v. 33, n. 3, p. 373-378, 2009.

SUNDARAMURTHY, D.; CAMPBELL, D. A.; LEEK, J. P.; *et al*. Assignment of the melanocortin 4 receptor (MC4R) gene to human chromosome band 18q22 by in situ hybridisation and radiation hybrid mapping. **Cytogenetics and Cell Genetics**, v. 82, n. 1–2, p. 97–98, 1998.

SWINBURN, Boyd A. et al. The global obesity pandemic: shaped by global drivers and local environments. **The lancet**, v. 378, n. 9793, p. 804-814, 2011.

VAISSE, C. et al. A frameshift mutation in human MC4R is associated with a dominant form of obesity. **Nature genetics**, v. 20, n. 2, p. 113–114, 1 out. 1998.

WARDLE, J. et al. Obesity Associated Genetic Variation in FTO Is Associated with Diminished Satiety. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 93, n. 9, p. 3640–3643, 1 set. 2008.

World Health Organization - WHO. Disponível em: http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/. Data de acesso: 29 de maio de 2023.

WU, Q. et al. The obesity-associated Fto gene is a transcriptional coactivator. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 401, n. 3, p. 390–395, 22 out. 2010.

XIA, Qianghua; GRANT, Struan FA. The genetics of human obesity. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1281, n. 1, p. 178-190, 2013.

YANG, Ming Ming et al. Variations in the obesity gene “LEPR” contribute to risk of type 2 diabetes mellitus: evidence from a meta-analysis. **Journal of diabetes research**, v. 2016, 2016.

YAZDI, Fereshteh T.; CLEE, Susanne M.; MEYRE, David. Obesity genetics in mouse and human: back and forth, and back again. **PeerJ**, v. 3, p. e856, 2015.

ZAYANI, Nesrine et al. Association of ADIPOQ, leptin, LEPR, and resistin polymorphisms with obesity parameters in Hammam Sousse Sahloul Heart Study. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 31, n. 6, p. e22148, 2017.

ZHANG, F. et al. Crystal structure of the obese protein leptin-E100. **Nature**, v. 387, n. 6629, p. 206–209, 8 may 1997.

ZHANG, Yiying et al. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. **Nature**, v. 372, n. 6505, p. 425-432, 1994.

ZHAO, Xue et al. Obesity increases the severity and mortality of influenza and COVID-19: a systematic review and meta-analysis. **Frontiers in Endocrinology**, v. 11, p. 595109, 2020.

CAPÍTULO 4

INIBIDORES DE PROTEINASES VEGETAIS: AVANÇOS E PERSPECTIVAS

Data de submissão: 09/05/2023

Data de aceite: 03/07/2023

Luís Antônio de Souza Junior
Universidade Federal do Mato Grosso do Sul
Três Lagoas – Mato Grosso do Sul
http://lattes.cnpq.br/0502347298944221

Luzia Aparecida Pando
Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia
Jequié - Bahia
http://lattes.cnpq.br/9815065840455790

Silvana Cristina Pando
Universidade Federal do Mato Grosso do Sul
Três Lagoas – Mato Grosso do Sul
http://lattes.cnpq.br/2557613056024752

RESUMO: Os inibidores de proteinases vegetais (IPs) são definidos como proteínas reguladoras com ampla distribuição em diferentes tecidos de várias espécies vegetais, que reduzem competitivamente e reversivelmente a atividade de proteinases alvo. Essas proteínas apresentam pontes dissulfeto e são resistentes a variações de pH, temperatura e proteólise. Devido a essas características físico-químicas, tem sido crescente os estudos sobre as propriedades antimicrobiana, anticoagulante e antitumoral desses inibidores de proteinases vegetais, evidenciando a relevância dessas proteínas na agricultura, biotecnologia e medicina. As plataformas usadas como base para a pesquisa foram: BVS, Scielo e PubMed, com os descritores: *inibidor de tripsina vegetal, serino proteinase, atividade anticoagulante, atividade inseticida e atividade antimicrobiana*, filtrados em artigos disponíveis no período de 2017 a 2022, em que, dos 31 artigos encontrados, 3 apresentaram atividade anticoagulante, 7 descreveram a atividade inseticida e 14 apresentaram atividade antimicrobiana e antifúngica dos inibidores vegetais. Os 7 artigos que tratavam de pesquisas com enfoques não pretendidos para essa análise foram descartados. Os inibidores, em sua maioria, foram isolados de sementes de espécies leguminosas. Pelas análises, foi possível destacar a importância das pesquisas com os inibidores vegetais, visando a caracterização de novos inibidores de fontes naturais capazes de modular a atividade biológica de proteinases para o controle de patógenos e como agentes anticoagulantes e antitrombóticos.

PALAVRAS-CHAVE: Serino proteinase; inibidor; patógeno; coagulação sanguínea; planta.

PLANT PROTEINASE INHIBITORS: ADVANCES AND PROSPECTS

ABSTRACT: Plant proteinase inhibitors (PIs) are defined as regulatory proteins with wide distribution in different tissues of several plant species, which competitively and reversibly reduce the activity of target proteinases. These proteins have disulfide bridges and are resistant to variations in pH, temperature and proteolysis. Due to these physico-chemical characteristics, studies have been increasing on antimicrobial, anticoagulant and antitumor properties of plant proteinase inhibitors, evidencing the relevance of these proteins in agriculture, biotechnology and medicine. The platforms used as the basis for the research were: BVS, Scielo and PubMed, with the keywords: plant trypsin inhibitor, serine proteinase, anticoagulant activity, insecticidal activity e antimicrobian activity, filtered in articles available in the period from 2017 to 2022, in which, of the 31 articles found, 3 showed activity anticoagulant, 7 showed insecticidal activity and 14 showed antimicrobial and antifungal activity of the plant inhibitors. The 7 articles dealing with research with approaches not intended for this analysis were discarded. Most inhibitors were isolated from seeds of leguminous species. From the analyses, it was possible to highlight the importance of research with plant inhibitors, seeking to characterize new inhibitors from natural sources capable of modulating the biological activity of proteinases for the control of pathogens and as anticoagulant and antithrombotic agents.
KEYWORDS: Serine proteinase; inhibitor; pathogen; blood coagulation; plant.

INTRODUÇÃO

Os inibidores de proteinases (IPs) são proteínas ou peptídios com potencial de interação com proteinases endógenas de animais, microrganismos e de plantas, onde ocorrem, inibindo competitivamente e reversivelmente a atividade enzimática (serino, cisteino, aspártico e metaloproteinase), formando complexo 1:1 ou 1:2. Os estudos pioneiros com sementes de soja, aumentaram o interesse pelos inibidores de proteinases, que se intensificaram no isolamento dessas proteínas em outras espécies leguminosas e demais famílias. Estes inibidores são classificados em diferentes famílias de acordo com a massa molecular, número de pontes dissulfeto, homologia na estrutura primária e homologia na sequência de seus domínios inibitórios, sendo os inibidores mais estudados pertencentes às famílias do tipo Kunitz e Bowman-Birk (Gitlin-Domagalska, *et al.*, 2020). Os inibidores do tipo Kunitz são constituídos por um ou mais de um domínio inibitório. Sua massa molecular varia de 18 a 24 kDa, embora algumas proteínas dessa classe tenham apresentado massa molecular de aproximadamente 8 kDa. Dentre as serino proteinases inibidas, destacam-se: tripsina, quimotripsina, elastase, calicreína, FXIa, FXIIa. Os inibidores desse grupo atuam como reguladores de importantes processos fisiológicos como a digestão, coagulação sanguínea e fibrinólise com ênfase para os estudos sobre seus efeitos antinutricionais no controle de insetos-praga, bactérias e fungos. Os inibidores do tipo Bowman-Birk (BBI) são proteínas com menor massa molecular, variando entre 5 a 16 kDa, com único ou duplo domínio inibitório e a expressão desses inibidores é elevada mediante danos. O menor inibidor BBI descrito apresentou 14 resíduos de aminoácidos. A maioria das moléculas

descritas apresenta sete pontes dissulfeto para estabilizar a sua estrutura. Dentre as serino proteinases inibidas, destacam-se: tripsina, quimotripsina, elastase (Pandey *et al.*, 2021).

O alvo dos inibidores são as proteinases, enzimas essenciais para a regulação de processos vitais em todos os organismos vivos, atuando na regulação de processos fisiológicos específicos como a ativação de zimogênios, liberação de peptídeos biologicamente ativos, liberação de hormônios precursores, reaproveitamento de aminoácidos ("*turnover*" de proteínas), na ativação ou translocação através da membrana e na coagulação sanguínea (Gitlin-Domagalska, *et al.*, 2020).

Os IPs estão presentes em bactérias, fungos, plantas e humanos. Em plantas, tem sido demonstrado que os inibidores podem ocorrer em raízes, folhas, sementes, caules, tubérculos e sementes, destacando o seu papel na defesa da planta contra insetos, pragas e microrganismos patogênicos. Os níveis dessas proteínas são elevados em resposta a diferentes condições de estresse, como injúria por ataque de insetos e patógenos e devido a parâmetros ambientais (salinidade, metais pesados e temperatura). No entanto, estudos recentes demonstraram também que existem interações entre planta e inibidor de proteinase, em decorrência do efeito alelopático em resposta a estresses abióticos (Pandey *et al.*, 2021).

Nos últimos 20 anos, os IPs têm atraído a atenção de vários grupos para as pesquisas com plantas transgênicas, uma vez que os IPs estão envolvidos diretamente na defesa da planta contra o ataque de insetos e outros patógenos (Filho *et al.*, 2017). Além disso, é crescente o interesse dos estudos sobre a aplicação biotecnológica dos IPs na inibição de enzimas humanas, incluindo não somente as enzimas digestivas (tripsina e quimotripsina), mas também sobre as enzimas que atuam na cascata de coagulação sanguínea (FXIa, FXIIa, calicreína plasmática) e na fibrinólise (plasmina), além de seu potencial efeito anti-inflamatório, demonstrado por Soualmia & El Amri (2018).

O objetivo geral do trabalho foi realizar pesquisa bibliográfica sobre os avanços e perspectivas dos inibidores de proteinases vegetais nos últimos cinco anos.

METODOLOGIA

Para o presente trabalho foi realizada a pesquisa bibliográfica como forma de coleta de dados. Para o levantamento dos dados foram consideradas as bases: Scielo, PubMed (NCBI) e Biblioteca Virtual da Saúde (BVS), sendo obtidos 24 artigos de interesse para esse estudo, publicados nos últimos cinco anos, o que corresponde ao período de 2017 a 2022, incluindo duas publicações de 2023, disponibilizadas para acesso *on line*. Os artigos foram localizados com os seguintes descritores: *plant trypsin inhibitor, serine proteinase, anticoagulant activity, insecticidal activity e antimicrobian activity.*

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os inibidores de proteinases (IPs) são resistentes a variações de pH e temperatura, apresentando propriedades biotecnológicas como agentes promissores para aplicação em diferentes áreas. Podemos citar o seu potencial inseticida na agricultura, no desenvolvimento de fármacos bioativos na medicina e a sua ação antimicrobiana na aplicação biotecnológica. No âmbito da medicina, temos que os inibidores proteolíticos têm sido investigados pela sua diversidade estrutural e pelo mecanismo específico que revela a atividade biológica dessas proteínas ou peptídeos. De fato, ao analisar os artigos selecionados para a revisão, foi possível notar o crescente interesse pela demonstração do papel dos IPs como agentes antitrombóticos, anticoagulantes e sua atividade antimicrobiana, obtidos a partir sementes, especialmente de espécies leguminosas (Hamad *et al.*, 2017; Gogoi et al., 2019; Cotabarren *et al.*, 2020).

Na base Scielo, foram considerados dois artigos, em que os autores isolaram um inibidor bifuncional de tripsina/alfa-amilase a partir do milho (*Zea mays* - Gramineae) e um novo inibidor termoestável de sementes da espécie *Geoffroea decorticans* (GdTI-Fabaceae). O inibidor bifuncional atuou inibindo seletivamente os fatores da cascata de coagulação sanguínea - FXIa e FXIIa. Já o inibidor GdTI prolongou a via intrínseca da cascata de coagulação. Em ambos estudos os inibidores foram considerados moléculas promissoras para o desenvolvimento de droga antitrombótica e anticoagulante. O processo de obtenção desses produtos naturais envolve procedimentos relativamente simples e com um custo menor do que os obtidos por processos de síntese química (Hamad et al. 2017; Cotabarren *et al.*, 2020).

Dentro da base de dados BVS foram encontrados 7 artigos, em que 5 descreveram dados sobre inibidores de proteinases isolados da família Fabaceae e 2 destacaram inibidores isolados de outras famílias (Solanaceae e Araceae). Entre os IPs caracterizados, três apresentaram atividade *in vitro* contra *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae), sendo dois pertencentes à família Fabaceae e obtidos a partir de sementes: o EcTI (*Enterolobium contortisiliquum* trypsin inhibitor), e o LsCTI (*Lonchocarpus sericeus* trypsin-chymotrypsin inhibitor) e um pertencente à família Araceae, designado alocasin, obtido a partir de rizoma maduro de *Alocasia macrorrhizos* (L.), com estudos *in vitro* e *in vivo*. Cabe destacar que, além de seu efeito, o EcTI também aumentou a atividade da toxina de *Bacillus thuringiensis*, o mais conhecido bioinseticida obtido a partir da bactéria Gram positiva com atividade entomopatogênica (Vajravijayan *et al.,* 2018; Tabosa *et al.* 2020). Os inibidores EcTI e alocasin, apresentaram massa molecular aparente de 20 KDa e homologia com outros inibidores do tipo Kunitz. Já LsCTI é um representante da família Bowman-Birk, com massa molecular de 8870.45 Da em SDS-PAGE e foi destacado como uma ferramenta em potencial para o controle de *A. aegypti*, uma vez que causou alta mortalidade das larvas (77%) e resultou em atraso do desenvolvimento em 37% (Almeida Filho *et al.,* 2018).

Além disso, Ferreira *et al*. (2019), descreveram a atividade inseticida de dois inibidores tipo Kunitz, recombinantes isolados de sementes de *Bauhinia bauhinioides* (Fabaceae), o rBbKI (kallikrein inhibitor) e rBbCI (cruzipain inhibitor), esse último com atividade também para inibir cisteíno proteinase.

Na mesma base de busca (BVS) encontrou-se o inibidor isolado de *Solanum tuberosum* (L.), designado (oPTI), com massa molecular de 12 KDa, onde este chama atenção pelo fato de ter demonstrado efeito inibitório contra 11 linhagens de microrganismos: *Acinetobacter* sp., *Salmonella* sp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus stearothermophilus*, *Escherichia coli* e *Yersinia enterocolitica* (Cisneros *et al*., 2020).

Ademais, dos inibidores isolados da família Fabaceae, LfTI (*Libidibia ferrea trypsin inhibitor*) apresentou efeito inibitório sobre a via intrínseca da coagulação sanguínea e mostrou efeitos anti-inflamatório e antinociceptivo, possivelmente relacionado com a inibição de proteinases inflamatórias e/ou dificultando a ativação de receptores ativados por proteinases. As propriedades anti-inflamatórias de *L. ferrea* foram confirmadas por seu caule, extratos de frutas, folhas, cascas e sementes, porém pouco se sabe sobre os compostos naturais que podem estar associados a essa resposta (Carvalho *et al*., 2023). O inibidor TTI (tamarindo *trypsin inhibitor*), é uma proteína com peso molecular de 20 KDa que apresentou peptídeos com atividade antimicrobiana (Oliveira *et al.,* 2022). Mohan *et al.* (2018) isolaram um inibidor de tripsina de sementes de *Macrotyloma uniflorum*, designado como MUPI com ação antifúngica e antimicrobiana. Outro inibidor de tripsina Kunitz, com atividade contra três espécies de *Candida*, foi isolado de sementes de *Enterolobium timbouva* (EtTI), o qual promoveu o desencadeamento de distúrbios na integridade da membrana plasmática e alterações morfológicas sucessivas, eventualmente mediadas por apoptose.

Na base de dados PubMed (NCBI), foram obtidos 15 artigos destacando inibidores Kunitz e Bowman-Birk, com atividades anticoagulante (2), inseticida (3) e antimicrobiana (10). Orfali *et al.* (2020), demonstraram atividade inseticida de inibidores de proteinases contra o inseto *Rhynchophorus ferrugineus*. Os estudos sobre a atividade inseticida dos IPs têm impacto econômico, ambiental e social em todo o mundo. Ainda sobre a atividade inseticida dos IPs, cabe destacar os estudos de Sallai *et al.* (2020), que testaram a atividade inseticida do inibidor de cisteino proteinase (AaCI-2S), presente em sementes de *Araucaria angustifolia*, contra *C. maculatus*, um inseto coleóptero. Segundo os autores, AaCI-2S, pode ser qualificado como uma proteína com propriedade inseticida natural. Segundo Pandey *et al.* (2021), os IPs são metabólitos naturais que defendem a planta contra o ataque de insetos e patógenos e são caracterizados como metabólitos de defesa estáveis há pelo menos quatro décadas. Os autores destacaram sobre a capacidade de resistência da planta contra o efeito antinutricional dos inibidores, em uma relação de veto proteico pelos inibidores das vias metabólicas da própria planta. Ferreira *et al.* (2019), demonstraram o efeito de dois inibidores de *Bauhinia bauhinioides* com diferentes especificidades para

enzimas intestinais de *Nasutitermes corniger* (order: Isoptera; family: Termitidae), em que este cupim assola a estrutura de residências ao consumir a madeira das edificações e mobiliários internos. Com relação à atividade antimicrobiana, foram encontrados no PubMed os seguintes dados mais relevantes: o inibidor de proteinase isolado de *Conyza dioscoridis* mostrou-se eficaz, inibindo o crescimento de bactérias Gram + e Gram -, e a tendência de atividade foi a seguinte (da menor concentração do extrato para a maior): *E. faecalis* (14 µg/mL) > *Salmonella entérica* (14,8 µg/mL) > *Klebsiella pneumoniae* (17,3 µg/mL) > *B. cereus* (19 µg/mL) e *S. epidermidis* (20 µg/mL). (Karray *et al*., 2020).

O inibidor LfTI, isolado de sementes de *Libidibia ferrea*, não apresentou efeito inibitório no crescimento dos patógenos bacterianos Gram positivos e Gram negativos testados*: Staphylococcus aureus* (+), *Streptococcus agalactiae* (+), *Escherichia coli* (-) e *Klebsiella pneumonie* (-). Ademais, a espécie *Candida albicans,* também testada, não teve efeito inibitório na presença do inibidor. (Rosseneger *et al*., 2017).

A maioria dos inibidores testados contra atividade antimicrobiana são específicos para serino proteinases e foram isolados das famílias Solanaceae, Fabaceae, Euphorbiaceae, Poaceae e Curcubitaceae. Com base nesse estudo podemos incluir a família Rhamnaceae (Bacha *et al*., 2017), em que os autores selecionaram cascas, frutas, folhas, raízes e sementes para isolar o inibidor de tripsina tipo Kunitz (RfIP1), o qual apresentou atividade inibitória mais expressiva contra bactérias Gram positivas, como *Staphylococcus aureus* do que Gram negativas. Os demais artigos encontrados também apresentaram estudos sobre o efeito de outros inibidores de tripsina e quimotripsina, sendo a maioria tipo Kunitz, contra bactérias Gram positivas e negativas e também com atividade contra fungos patogênicos e fitopatogênicos. (Nabi *et al*., 2018)

Após a análise das publicações nas três bases de dados (Scielo, PubMed, BVS) e no período proposto para esse trabalho, foi possível agrupar os principais enfoques destacados na literatura sobre os estudos de atividade biológica dos inibidores de proteinases, especialmente, Kunitz e Bowman-Birk **(Figura 1)**.

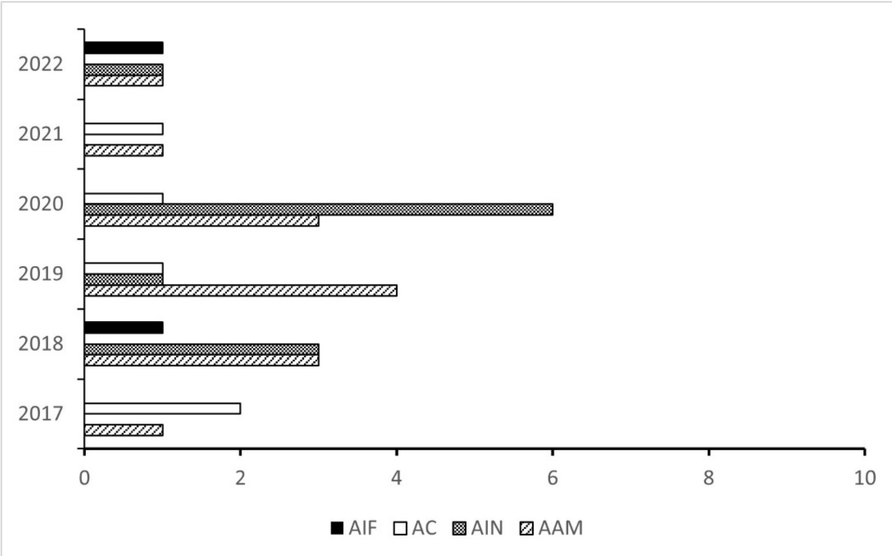


Figura 1 – Número de publicações por abordagem de estudo, em que temos: AIF (Atividade Anti Inflamatória), AC (Atividade anticoagulante), AIN (Atividade inseticida) e AAM (Atividade antimicrobiana) no período entre 2017-2022.

Foi possível observar o grande interesse dos grupos de pesquisa, nacional e internacional, na avaliação da atividade antimicrobiana dos inibidores de proteinases vegetais, isolados de diferentes espécies e famílias de plantas, com publicações em todo o período pesquisado. Em seguida, observou-se o interesse pelas pesquisas sobre a atividade anticoagulante e inseticida dos IPs. Entre 2018 e 2022, obtivemos publicações sobre a atividade dos IPs no processo inflamatório, em modelo animal.

Na **tabela 1** estão apresentados todos os trabalhos utilizados para análise e registro com informações estruturais e funcionais dos inibidores de proteinases de diferentes espécies vegetais.

Inibidores de proteinase	Espécie	Informações relevantes	Referências
CTI	*Zea mays L*	Primeiramente isolado na década de 70. Inibidor bifuncional (tripsina/alfa amilase) com ação anticoagulante.	(Hellum *et al.* 2017)
GdTI	*Geoffroea decorticans* (Gill. ex Hook. et Arn.)	Possui um peso molecular de 20 KDa, pertencente à superfamília BBI (Bowman-Birk Inhibitor). Testes hipoglicemiantes com GdTI demonstraram forte inibição da enzima α-glicosidase e ação do inibidor na regulação dos níveis de glicose no sangue. Possui atividade anticoagulante.	(Cotabarren *et al.* 2020)

EtTI	Enterolobium timbouva	Possui duas cadeias polipeptídicas com um peso molecular de 20 KDa, tipo Kunitz, sendo específico para a inibição da tripsina com ação antimicrobiana.	(de Oliveira *et al.* 2018)
MuIP	*Macrotyloma uniflorum*	Tal inibidor tem a presença de serina no sítio reativo do IP que desempenha papel fundamental no mecanismo de inibição da protease. Possui peso molecular de 25 KDa. Apresenta ação antimicrobiana.	(Mohan *et al.* 2018)
TTI	*Tamarindus indica L.*	Possui 184 resíduos de aminoácidos, com um peso molecular de 20 KDa. Apresenta atividade antimicrobiana	(Oliveira *et al.* 2023) *(Disponível on line - 2022)*
LfTI	*Libidibia ferrea*	O inibidor possui massa molecular de 18 KDa, fazendo parte da família Kunitz. Testes recentes avaliaram o efeito anti-inflamatório e antinociceptivo do inibidor.	(Carvalho *et al.* 2023) *(Disponível on line - 2022)*
OpTI	*Solanum tuberosum L.*	Inibidor com um pró-segmento N-terminal de 13 aminoácidos seguido por 71 resíduos da proteína. Sua massa molecular foi determinada em 12, 090.05 Da. Sua estrutura é rica em regiões de leucina, glutamato, isoleucina e valina; Esta proteína é altamente conservada, desde sua sequência genética até sua semelhança com o inibidor de tripsina de outra variedade, a *S. tuberosum subsp. andigenum var. overa.* Apresenta atividade antimicrobiana.	(Cisneros *et al.* 2020)
BbKI **BbCI**	*Bauhinia bauhinioides*	BbCI é um inibidor de cisteíno proteinase similar a inibidores do tipo Kunitz, mas sem resíduos de cisteína e metionina, por isso tal proteína apresenta maior resistência. A diferença entre a estrutura dos inibidores BbKI e BbCI é de suma importância no mecanismo de ação sobre o trato digestivo de cupins e os meios de impedir seu ciclo reprodutivo como método inseticida. Apresenta atividade inseticida.	(Ferreira *et al.* 2019)
LsCTI	*Lonchocarpus sericeus* (Poir.) Kunth ex DC	Contém uma massa molecular de aproximadamente 9 KDa. A estrutura desse inibidor varia entre 4 isoformas, pertencentes ao grande grupo dos BBI (Bowman-Birk Inhibitor). Apresenta atividade inseticida.	(Almeida Filho e*t al.* 2018)
Alocasin	*Alocasia macrorrhizos* (L.) G.Don	A estrutura desse inibidor é estabilizada por três ligações dissulfeto (Cys39–Cys84, Cys154–Cys169 and Cys156–Cys165.). Tal proteína é semelhante ao grupo da família Kunitz. Apresenta atividade inseticida.	(Vajravijayan *et al.* 2018)

EcTI	*Enterolobium contortisiliquum*	O inibidor apresenta propriedade bioinseticida causando a morte, interferindo no crescimento ou desenvolvimento de insetos.Sua estrutura conta com 28 resíduos de aminoácidos 100% parecido com a ponta N terminal do inibidor de tripsina do tipo Kunitz. Apresenta atividade inseticida.	(Tabosa *et al.* 2020)
STI	Soybean trypsin inhibitor	Proteína monomérica composta por 181 aminoácidos com duas pontes dissulfeto de massa molecular de 20,1 kDa. Apresenta atividade antimicrobiana	(Islam *et al.* 2019)
IITI	*Inga laurina*	Este inibidor pode ser utilizado em associação a filmes polissacarídeos/PVA na atenuação do efeito medicamentoso para recuperação de tecidos, em que este inibidor, devido a sua propriedade bioquímica, é retido inicialmente e liberado ao organismo de maneira gradual. Essa análise é promissora para o desenvolvimento de protocolos refinados. Apresenta atividade antimicrobiana	(Cruz *et al.* 2019)
AcIT (SPI's)	*Amburana cearensis*	A associação do inibidor a antibióticos potencializa a sua ação, evitando a formação de resistências bacterianas como de *E. coli*, por exemplo. Este é de relevância no desenvolvimento de medicamentos antimicrobianos.	(Oliveira *et al.* 2020)
ClCI	*Coix lacryma-*jobi L.	O inibidor possui massa molecular de 7.9 kDa com a sequência N-terminal (KTSWPE) e a sequência C-terminal (RVRIF) determinadas. Apresenta atividade antimicrobiana	(Ruan *et al.* 2019)
SjPi- 1 e SjPi 2	*Sophora japonica*	Inibidor de proteinase (PI), SjPi-1 possui massa molecular de 15 KDa e a SjPi-2 possui 31 KDa. Dessa maneira, temos que SjPi 1 é classificada na família Bowman-Birk e a SjPi-2 na família Kunitz. Apresenta atividade antimicrobiana	(Nabi *et al.* 2018)
MuPi	*Macrotyloma uniflorum*	A presença de serina no sítio reativo do PI desempenha papel chave no mecanismo de inibição da proteinase. Apresenta atividade antimicrobiana	(Mohan *et al.* 2018)
RfIP1	*Rhamnus frangula*	O inibidor possui massa molecular de 22.5 Kda, sendo então classificado na família de inibidores de serino proteinase Kunitz. Sua sequência NH2-terminal dos primeiros 33 resíduos foi determinada, sustentando um significativo grau de homologia com a família Kunitz. Apresenta atividade antimicrobiana	(Bacha *et al.* 2017)

oPTI	*Solanum tuberosum L.*	Foi comprovada a ação antimicrobiana do inibidor para uma gama de patógenos, sendo previsto estudos futuros para desenvolvimento de antibióticos e conservantes com oPTI. Seu peso molecular é de 20 KDa. Apresenta atividade antimicrobiana	(Cisneros *et al.* 2020)
CCTI	*Cajanus cajan*	O inibidor demonstrou ação antimicrobiana persistente, inibindo crescimento bacteriano. Espécies fúngicas não demonstram ação inibitória na presença de tal proteína. Ademais, este inibidor demonstrou capacidade de inibir doenças causadas por estresse oxidativo e inflamação. Seu peso molecular foi elucidado (14 Kda). Apresenta atividade antimicrobiana	(Shamsi *et al.* 2018)
PDInhibitor	*Conyza dioscoridis*	O inibidor de proteinase possui massa molecular de 25 kDa, pertencendo a família Kunitz. Apresentou atividade antibacteriana (tanto para as gram positivas, quanto as gram negativa) e antifúngica acentuada, além de afetar linhas de células cancerosas humanas (HCT-116, MDA-MB-231, e Lovo), sendo uma proteína promissora. Apresenta atividade antimicrobiana	(Karray *et al.* 2020)
MoPI	*Moringa oleifera*	Caracterização da primeira fitocistatina em *Moringa oleifera*, em que se elucidou seu peso molecular (19 kDa), sua forte ação antimicrobiana contra patógenos humanos (*Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus aureus*) e ação anticoagulante. Ademais, tal estrutura apresenta alta resistência às mudanças de pH e temperatura. Apresenta atividade antimicrobiana	(Cotabarren *et al.* 2021)
AaCI-2S	*Araucaria angustifolia*	Este inibidor de cisteína apresenta potencial efeito inseticida contra *Nasutitermes corniger* com um peso molecular de 18 KDa e resistência a mudança nos valores de pH e temperatura. A proteína inibiu o desenvolvimento de linhas de células de câncer gástrico e de próstata. Apresenta atividade inseticida	(Sallai *et al.* 2020)
DKEIP's	Inibidores de proteases presentes em folhas de palmeira, tâmaras e caroço de tâmaras	DKE inibiu alguns tipos de enzimas proteases digestivas do intestino médio de *Rhynchophorus ferrugineus,* indicando potencial no desenvolvimento de pesticidas sustentáveis. Apresenta atividade inseticida	(Orfali *et al.* 2020)

Tabela 1. Relação de pesquisas sobre inibidores de proteinases, resultante das buscas nas bases de dados SciElo, PubMed e BVS.

CONCLUSÃO

A partir do levantamento bibliográfico realizado conclui-se que há um interesse crescente pela investigação das propriedades físico-químicas, estruturais e aplicações de inibidores de proteinases vegetais, especialmente na sua purificação, caracterização e avaliação dos efeitos contra insetos/pragas, microrganismos patogênicos e sua ação anticoagulante. Tal estudo constata que a obtenção de novos compostos sintéticos a partir de compostos naturais termoestáveis obtidos de sementes de espécies leguminosas, é relevante para a descoberta de bioinseticidas, antifúngicos e novos fármacos para o tratamento de diversas doenças humanas.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA FILHO LCP, TABOSA PMS, HISSA DC, VASCONCELOS IM & CARVALHO AFU. 2018. **First insights into insecticidal activity against *Aedes aegypti* and partial biochemical characterization of a novel low molecular mass chymotrypsin-trypsin inhibitor purified from *Lonchocarpus sericeus* seeds**. Pest Manag Sci 74: 1362–1373.

BACHA A ben, JEMEL I, MOUBAYED NMS & ABDELMALEK I ben. 2017. **Purification and characterization of a newly serine protease inhibitor from *Rhamnus frangula* with potential for use as therapeutic drug**. 3 Biotech 7.

CARVALHO R, BONFÁ IS, DE ARAÚJO ISAÍAS MULLER J, PANDO SC & TOFFOLI-KADRI MC. 2023. **Protease inhibitor from *Libidibia ferrea* seeds attenuates inflammatory and nociceptive responses in mice**. J Ethnopharmacol 300.

CISNEROS JS, COTABARREN J, PARISI MG, VASCONCELOS MW & OBREGÓN WD. 2020. **Purification and characterization of a novel trypsin inhibitor from *Solanum tuberosum* subsp. andigenum var. overa: Study of the expression levels and preliminary evaluation of its antimicrobial activity**. Int J Biol Macromol 158: 1279–1287.

CLEMENTE, M., CORIGLIANO, M. G., PARIANI, S. A., SÁNCHEZ-LÓPEZ, E. F., SANDER, V. A., & RAMOS-DUARTE, V. A. (2019). **Plant serine protease inhibitors: Biotechnology application in agriculture and molecular farming.** In International Journal of Molecular Sciences (Vol. 20, Issue 6). MDPI AG. https://doi.org/10.3390/ijms20061345.

COTABARREN J, BROITMAN DJ, QUIROGA E & OBREGÓN WD. 2020. **GdTI, the first thermostable trypsin inhibitor from *Geoffroea decorticans* seeds.** A novel natural drug with potential application in biomedicine. Int J Biol Macromol 148: 869–879.

COTABARREN J, CLAVER S, PAYROL JA, GARCIA-PARDO J & OBREGÓN WD. 2021. **Purification and characterization of a novel thermostable papain inhibitor from *moringa oleifera* with antimicrobial and anticoagulant properties.** Pharmaceutics 13.

COTABARREN J, LUFRANO D, PARISI MG & OBREGÓN WD. 2020. **Biotechnological, biomedical, and agronomical applications of plant protease inhibitors with high stability: A systematic review.** Plant Science 292.

FERREIRA RS, BRITO M v., NAPOLEÃO TH, SILVA MCC, PAIVA PMG & OLIVA MLV. 2019**. Effects of two protease inhibitors from *Bauhinia bauhinoides* with different specificity towards gut enzymes of Nasutitermes corniger and its survival.** Chemosphere 222: 364–370.

GITLIN-DOMAGALSKA A, MACIEJEWSKA A & DĘBOWSKI D. 2020. **Bowman-birk inhibitors: Insights into family of multifunctional proteins and peptides with potential therapeutical applications**. Pharmaceuticals 13: 1–40.

GOGOI D, RAMANI S, BHARTARI S, CHATTOPADHYAY P & MUKHERJEE AK. 2019. **Characterization of active anticoagulant fraction and a fibrin(ogen)olytic serine protease from leaves of *Clerodendrum colebrookianum*, a traditional ethno-medicinal plant used to reduce hypertension**. J Ethnopharmacol 243.

HAMAD BK, PATHAK M, MANNA R, FISCHER PM, EMSLEY J & DEKKER L v. 2017**. Assessment of the protein interaction between coagulation factor XII and corn trypsin inhibitor by molecular docking and biochemical validation.** Journal of Thrombosis and Haemostasis 15: 1818–1828.

KARRAY A, ALONAZI M, SMAOUI S, MICHAUD P, SOLIMAN D & BACHA A ben. 2020**. Purification and Biochemical Characterization of a New Protease Inhibitor from *Conyza dioscoridis* with Antimicrobial, Antifungal and Cytotoxic Effects**. Molecules 25.

MOHAN M, KUMARI M & ELYAS KK. 2018. **Antifungal and Antimicrobial Properties of a Purified Protease Inhibitor from *Macrotyloma Uniflorum* Seeds.** Curr Top Med Chem 18: 2491–2501.

NABI M, BHAT A, RASOOL SUA, ASHRAF S, MAQBOOL R, GANIE SA & AMIN S. 2018. **Physio-chemical characterization and anti-microbial activity of serine protease inhibitors purified from the *Sophora japonica* seeds**. Pakistan Journal of Biological Sciences 21: 432–440.

OLIVEIRA GS de, NASCIMENTO AM de S, LUZ ABS, AGUIAR AJFC, LIMA MSR, MATIAS LLR, AMADO IR, PASSOS TS, DAMASCENO KSF da SC, MONTEIRO N de KV, MOREIRA SMG, PASTRANA L & MORAIS AH de A. 2022. **Prospecting in silico antibacterial activity of a peptide from trypsin inhibitor isolated from tamarind seed**. J Enzyme Inhib Med Chem 38: 67–83.

OLIVEIRA MTA, MOURA GMM, DA CRUZ JIO, LIMA RVC, DOS SANTOS EA, ANDRADE JC, ALENCAR MVOB, LANDIM VPA, COUTINHO HDM & UCHOA AF. 2020**. Serine protease inhibition and modulatory-antibiotic activity of the proteic extract and fractions from Amburana cearensis**. Food and Chemical Toxicology 135.

ORFALI R, BINSUWAILEH A, ABU AL-ALA'A H, BANE-GAMEA S, ZAIDAN N, ABDELAZIM M, ALHASAN ISMAEL M, PERVEEN S, MAJRASHI N, ALLUHAYB K & ORFALI RS. 2020**. Production of a biopesticide on host and Non-Host serine protease inhibitors for red palm weevil in palm trees**. Saudi J Biol Sci 27: 2803–2808.

PANDEY A, YADAV R & SANYAL I. 2021. **Evaluating the pesticidal impact of plant protease inhibitors: lethal weaponry in the co-evolutionary battle.** Pest Manag Sci 78: 855–868.

ROSENEGGER PF, FALCÃO LS, BERNARDES LG, OLIVEIRA MD, MACHADO AM, MACHADO ARSR 2017. **Investigation of antimicrobial and anticoagulant effects of trypsin inhibitor from *Caesalpinia ferrea* var. cearensis.** Journal of Medical and Biological Sciences. 4:1.

SALLAI RC, SALU BR, SILVA-LUCCA RA, ALVES FL, NAPOLEÃO TH, PAIVA PMG, FERREIRA R da S, SAMPAIO MU & OLIVA MLV. 2020. **Biotechnological potential of *araucaria angustifolia* pine nuts extract and the cysteine protease inhibitor AaCi-2S.** Plants 9: 1–19.

TABOSA PMS, ALMEIDA FILHO LCP, FRANCA RX, ROCHA-BEZERRA LCB, VASCONCELOS IM & CARVALHO AFU. 2020**. Trypsin inhibitor from *Enterolobium contortisiliquum* seeds impairs Aedes aegypti development and enhances the activity of *Bacillus thuringiensis* toxins**. Pest Manag Sci 76: 3693–3701.

VAJRAVIJAYAN S, PLETNEV S, PLETNEV VZ, NANDHAGOPAL N & GUNASEKARAN K. 2018. **Crystal structure of a novel Kunitz type inhibitor, alocasin with anti-Aedes aegypti activity targeting midgut proteases**. Pest Manag Sci 74: 2761–2772.

CAPÍTULO 5

ESTUDO DAS INTERAÇÕES DA PROTEÍNA NS5A DO VÍRUS DA HEPATITE C COM PROTEÍNAS DO HOSPEDEIRO HUMANO: ANÁLISE BASEADA EM REDE DE INTERAÇÃO

Data de submissão: 06/05/2023 *Data de aceite: 03/07/2023*

Manuel Bezerra de Menêses Neto
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro
Rio de Janiero – RJ
https://lattes.cnpq.br/0488434579775030

Luísa Hoffmann
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro
Rio de Janiero – RJ
http://lattes.cnpq.br/2379740311109634

Roberta Kuan Tchuen de Mello Loh
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro
Rio de Janiero – RJ
http://lattes.cnpq.br/2766620698228444

Juliene Antonio Ramos
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro
Rio de Janiero – RJ
http://lattes.cnpq.br/9839743323007741

RESUMO: Estima-se que a infecção pelo vírus da hepatite C (HCV) acometa 58 milhões de pessoas em todo o mundo. Cerca de 80% dos infectados evolui para infecção crônica. Após a cronificação é observada uma progressão natural da doença caracterizada por um quadro de inflamação persistente, que gera fibrose tecidual, podendo evoluir para cirrose hepática e carcinoma hepatocelular (CHC). A proteína não estrutural NS5A do HCV é uma fosfoproteína com grande importância para a replicação, propagação e patogênese viral. O objetivo deste trabalho é realizar um estudo baseado em análise de rede das interações da proteína NS5A do HCV com proteínas humanas para melhor compreender o seu papel no desenvolvimento do CHC. Inicialmente foi realizado um levantamento bibliográfico das proteínas humanas que interagem com NS5A. Interações proteína-proteína (PPIs) da lista de proteínas obtidas pelo levantamento foram coletadas através da plataforma STRING, e, também, os dados de estatística de rede e enriquecimento funcional para vias da base de dados KEGG. Foi construída uma rede de interação de NS5A contendo interações entre proteínas virais e humanas e realizado uma análise topológica de rede através do programa Cytoscape 3.8.2. Foram encontradas 221 proteínas que interagem com NS5A. Com a análise topológica foram encontrados 22 gargalos para rede de interação de NS5A, sendo 16 já previamente descritos e 6 novos. Com a análise funcional, 104 vias

de 21 diferentes categorias do KEGG foram enriquecidas para a rede de PPIs humanas. Foram encontrados vários gargalos da rede de interação de NS5A em vias de categorias do KEGG relacionadas ao câncer. A proteína GRB2 parece ser um gargalo proeminente de ser regulado por NS5A para o desenvolvimento do CHC.
PALAVRAS-CHAVE: HCV, NS5A, rede de interação, análise funcional de rede, carcinoma hepatocelular.

STUDY OF THE INTERACTIONS OF HEPATITIS C VIRUS NS5A PROTEIN WITH HUMAN HOST PROTEINS: INTERACTION NETWORK-BASED ANALYSIS

ABSTRACT: It is estimated that hepatitis C virus (HCV) infection affects 58 million people worldwide. About 80% of those infected progress to chronic infection. After chronification, it is observed a natural progression of the disease characterized by a persistent inflammation, which generates tissue fibrosis that can progress to liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma (HCC). The non-structural protein NS5A is a phosphoprotein that has great importance for the replication, propagation and pathogenesis of HCV. Several interactions of NS5A protein with human proteins have been described. The objective of this work is to carry out a study based on network analysis of the interactions of the HCV NS5A protein with human proteins to better understand its role in the development of HCC. Initially, a literature survey of human proteins that interact with NS5A was conducted. Protein-protein interactions (PPIs) of the list of proteins generated by the survey were collected through the STRING platform, as well as network statistics and functional enrichment data for KEGG pathways. An NS5A interaction network containing interactions between viral and human proteins was constructed and a network topological analysis was performed with Cytoscape 3.8.2 software. A total of 221 proteins that interact with NS5A were found. With the topological analysis, 22 bottlenecks were found for the NS5A interaction network, 16 of which were previously described and 6 were new. With the functional analysis, 104 KEGG pathways from 21 KEGG categories were enriched for the human PPI network. Several bottlenecks of the NS5A interaction network in the KEGG pathways present in cancer related categories were found. The GRB2 protein appears to be a prominent bottleneck that can be regulated by NS5A for the development of hepatocarcinoma.
KEYWORDS: HCV, NS5A, interaction network, functional network analysis, hepatocellular carcinoma.

1 I INTRODUÇÃO

Estima-se que a infecção pelo vírus da hepatite C (HCV) acometa 58 milhões de pessoas em todo o mundo, sendo responsável por milhares de mortes todos os anos (WHO, 2022). Após a infecção aguda, 50-80% dos infectados pelo HCV evoluem para a infecção crônica (MANNS, 2021). Após a cronificação da doença hepática é observado uma progressão da doença, caracterizada por um quadro de inflamação persistente que gera fibrose tecidual, podendo evoluir para a cirrose hepática e até mesmo para o carcinoma hepatocelular (CHC) com um risco anual de 1 à 5 % (WESTBROOK; DUSHEIKO, 2014).

O genoma viral é traduzido em uma poliproteína de cerca de 3000 aminoácidos que é clivada para a produção de três proteínas estruturais, e sete não estruturais (NS) (TABATA et al., 2019). A proteína NS5A, alvo deste estudo, é uma fosfoproteína de 447 aminoácidos que possui dois estados de fosforilação: uma forma fosforilada com 56 kDa e outra hiperfosforilada com 58 kDa (REYES, 2002). Esta proteína viral é composta por uma alfa-hélice anfipática N-terminal e três domínios estruturais. Os domínios II e III são intrinsecamente desdobrados e possuem uma certa flexibilidade estrutural, o que permite a interação com diversas proteínas humanas (BARTENSCHLAGER et al., 2013).

Interações proteína-proteína (PPIs) entre vírus-hospedeiro são essenciais para a propagação viral e estratégias virais de evasão do sistema imune para o estabelecimento da infecção crônica (GERMAIN, et al. 2014), além de desempenharem um papel importante na hepatocarcinogênese (HAN, et al. 2016). Desta forma, elucidar as interações patógeno-hospedeiro é de grande importância para uma melhor compreensão da patogênese viral e dos mecanismos moleculares pela qual um vírus causa comorbidades.

2 | OBJETIVO

Realizar um estudo baseado em análise de rede das interações da proteína NS5A do vírus da hepatite C com proteínas humanas para melhor compreender o seu papel no desenvolvimento do carcinoma hepatocelular.

3 | METODOLOGIA

3.1 Estudo das interações de NS5A com proteínas do hospedeiro e análise de redundância

Foi realizado um levantamento bibliográfico de artigos científicos através da busca em resumos de artigos das palavras-chave combinadas: “HCV, NS5A, Interaction” na plataforma PubMed do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). Todos os artigos foram analisados individualmente, e foi buscado em seu texto resultados que demostrassem a interação física da proteína viral NS5A com alguma proteína humana. Para avaliar possíveis repetições de proteínas foram coletados os identificadores dos genes (GeneID) referentes a cada proteína na plataforma GENE do NCBI, juntamente com a sua descrição e nome oficial.

3.2 Rede de interação proteína-proteína e análise funcinal

Interações físicas de alta confiança das proteínas humanas que interagem com NS5A foram recuperadas da plataforma STRING (STRING, 2021). Foram analisadas as proteínas encontradas no banco de dados da plataforma e selecionadas as opções de filtragem para interações físicas e pontuação mínima de interação igual a 0,700 para diminuir falsos

positivos em nossa análise. As interações físicas são recuperadas de banco de dados, mineração da literatura e experimentos, e a pontuação é obtida a partir da existência de interação nestes bancos de dados. Também foram coletados os dados de estatística da rede e enriquecimento funcional de vias da base de dados KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) (KEGG, 2021) gerados pelo STRING. O enriquecimento funcional é estimado pelo Teste Exato de Fisher sendo o p-valor corrigido segundo o procedimento de Benjamini–Hochberg para obtenção do FDR (*False Discovery Rate*) (BENJAMINI; HOCHBERG, 1995). Posteriomente a rede de interação foi exportada para o Cytoscape 3.8.2 (CYTOSCAPE, 2021).

3.3 Análise topológica

Uma análise topológica da rede de interação de NS5A foi realizada através do *plugin* Cytoscape Network Analyzer do programa Cytoscape 3.8.2. Esta análise foi realizada sobre a rede de interação de proteínas humanas com as interações de NS5A. Foram coletados os dados de grau de interação ("Degree") que refere-se à quantidade de conexões de um nó da rede, e Centralidade de intermediação ("Betweenness centrality") que avalia o número de caminhos mínimos que passam por um nó, sendo caminhos mínimos definidos como a menor sequência de arestas que conectam dois vértices. Posteriomente foi feito uma tabela ranqueando as proteínas analisadas segundo a medida de Centralidade de intermediação.

4 I RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Interações físicas da proteína NS5A do vírus da Hepatite C com proteínas humanas

Com o levantamento bibliográfico das interações físicas foram encontradas 221 proteínas humanas que interagem fisicamente com NS5A (Tabela 1). Recentemente, foram descritas um total de 132 proteínas que interagem fisicamente com NS5A por TRIPATHI et al., 2013, e 108 interações por HAN, et al., 2016. Nosso estudo descreve outras 81 interações. Foi mostrado que proteínas com domínios desdobrados atuam como centralizadores "hubs", ao interagirem com várias outras proteínas (UVERSKY et al., 2008). Este grande número de interações físicas de NS5A com proteínas humanas pode ser explicado por esta proteína viral possuir dois domínios desdobrados, que possuem uma certa flexibilidade estrutural (BARTENSCHLAGER, 2013), o que permite a exposição de diferentes sítios de ligação que são reconhecidos por proteínas celulares distintas.

n	GENE ID	PROTEÍNAS	REFERÊNCIA
1	5610	PKR (EIF2AK2)	GALE et al., 1997
2	2885	GRB2	TAN et al., 1999
3	9218	hVAP-33 (VAP-A)	TU et al., 1999
4	983	Cdk1	ARIMA et al., 2001
5	7157	p53 (TP53)	LAN et al., 2002
6	335	ApoA1	SHI et al., 2002
7	6908	TBP	QADRI et al., 2002
8	7186	TRAF2	PARK et al., 2003
9	274	Amphiphysin II (BIN1)	ZECH et al., 2003
10	5291	PIK3R1	HE et al., 2002
11	581	Bax	CHUNG et al., 2003
12	7001	PTX1 (PRDX2)	GHOSH et al., 2003
13	4938	2,5OAS (OAS1)	TAGUCHI et al., 2004
14	3315	HSP27 (HSPB1)	CHOI et al., 2004
15	3055	Hck	MACDONALD et al., 2004
16	3932	Lck	MACDONALD et al., 2004
17	4067	Lyn	MACDONALD et al., 2004
18	2534	Fyn	MACDONALD et al., 2004
19	9217	VAP-B	HAMAMOTO et al., 2005
20	5894	Raf-1	BÜRCKTÜMMER et al., 2006
21	7046	TβR-I (TGFBR1)	CHOI, HWANG., 2006
22	6772	STAT1	LAN et al., 2007
23	1452	CKI (CSNK1A1)	QUINTAVALLE et al., 2007
24	128637	TBC1D20	SKLAN et al., 2007
25	51495	hB-ind1 (PTPLAD1)	TAGUWA et al., 2008
26	6850	Syk	INUBUSHI et al., 2008
27	348	ApoE	JIANG, LUO, 2009
28	3303	HSP70 (HSPA1A)	GONZALEZ et al., 2009
29	10294	HSP40 (DNAJA2)	GONZALEZ et al., 2009
30	5007	OSBP	AMAKO et al., 2009
31	1499	β-catenina (CTNNB1)	MILWARD et al., 20010
32	5478	CypA (PPIA)	CHATTERJI et al., 2010
33	5297	PI4KIIIα (PI4Kα)	LIM, HWANG, 2011
34	5300	PIN1	LIM et al., 2011
35	91543	Viperin (RSAD2)	HELBIG., 2011
36	6927	HNF1α	MATSUI et al., 2012
37	47	ACLY	TRIPHAT et al., 2013

38	60	ACTB	TRIPHAT et al., 2013
39	79026	AHNAK	TRIPHAT et al., 2013
40	10598	AHSA1	TRIPHAT et al., 2013
41	207	AKT1	TRIPHAT et al., 2013
42	302	ANXA2	TRIPHAT et al., 2013
43	116985	ARAP1	TRIPHAT et al., 2013
44	27236	ARFIP1	TRIPHAT et al., 2013
45	23204	ARL6IP1	TRIPHAT et al., 2013
46	4508	ATP6 (MT-ATP6)	TRIPHAT et al., 2013
47	8312	AXIN1	TRIPHAT et al., 2013
48	222389	BEND7	TRIPHAT et al., 2013
49	89927	C16orf45	TRIPHAT et al., 2013
50	8618	CADPS	TRIPHAT et al., 2013
51	93664	CADPS2	TRIPHAT et al., 2013
52	79080	CCDC86	TRIPHAT et al., 2013
53	1021	CDK6	TRIPHAT et al., 2013
54	1060	CENPC1	TRIPHAT et al., 2013
55	153241	CEP120	TRIPHAT et al., 2013
56	11190	CEP250	TRIPHAT et al., 2013
57	9702	CEP57	TRIPHAT et al., 2013
58	80254	CEP63	TRIPHAT et al., 2013
59	1381	CRABP1	TRIPHAT et al., 2013
60	1445	CSK	TRIPHAT et al., 2013
61	1457	CSNK2A1	TRIPHAT et al., 2013
62	9093	DNAJA3	TRIPHAT et al., 2013
63	2202	EFEMP1	TRIPHAT et al., 2013
64	2051	EPHB6	TRIPHAT et al., 2013
65	54942	FAM206A	TRIPHAT et al., 2013
66	25827	FBXL2	TRIPHAT et al., 2013
67	2274	FHL2	TRIPHAT et al., 2013
68	23770	FKBP8	TRIPHAT et al., 2013
69	2316	FLNA	TRIPHAT et al., 2013
70	2495	FTH1	TRIPHAT et al., 2013
71	8880	FUBP1	TRIPHAT et al., 2013
72	11345	GABARAPL2	TRIPHAT et al., 2013
73	54826	GIN1	TRIPHAT et al., 2013
74	2801	GOLGA2	TRIPHAT et al., 2013
75	2874	GPS2	TRIPHAT et al., 2013

76	2931	GSK3A	TRIPHAT et al., 2013
77	2932	GSK3B	TRIPHAT et al., 2013
78	3320	HSP90AA1	TRIPHAT et al., 2013
79	3537	IGLC1	TRIPHAT et al., 2013
80	79711	IPO4	TRIPHAT et al., 2013
81	3843	IPO5	TRIPHAT et al., 2013
82	3683	ITGAL	TRIPHAT et al., 2013
83	6453	ITSN1	TRIPHAT et al., 2013
84	3716	JAK1	TRIPHAT et al., 2013
85	55679	LIMS2	TRIPHAT et al., 2013
86	9448	MAP4K4	TRIPHAT et al., 2013
87	6300	MAPK12	TRIPHAT et al., 2013
88	4155	MBP	TRIPHAT et al., 2013
89	4256	MGP	TRIPHAT et al., 2013
90	55233	MOB1A	TRIPHAT et al., 2013
91	4673	NAP1L1	TRIPHAT et al., 2013
92	4674	NAP1L2	TRIPHAT et al., 2013
93	10397	NDRG1	TRIPHAT et al., 2013
94	4778	NFE2	TRIPHAT et al., 2013
95	11188	NISCH	TRIPHAT et al., 2013
96	4924	NUCB1	TRIPHAT et al., 2013
97	64098	PARVG	TRIPHAT et al., 2013
98	5170	PDPK1	TRIPHAT et al., 2013
99	5291	PIK3CB	TRIPHAT et al., 2013
100	5307	PITX1	TRIPHAT et al., 2013
101	5347	PLK1	TRIPHAT et al., 2013
102	10654	PMVK	TRIPHAT et al., 2013
103	10848	PPP1R13L	TRIPHAT et al., 2013
104	5515	PPP2CA	TRIPHAT et al., 2013
105	5518	PPP2R1A	TRIPHAT et al., 2013
106	5698	PSMB9	TRIPHAT et al., 2013
107	5757	PTMA	TRIPHAT et al., 2013
108	6142	RPL18A	TRIPHAT et al., 2013
109	6167	RPL37	TRIPHAT et al., 2013
110	6238	RRBP1	TRIPHAT et al., 2013
111	6252	RTN1	TRIPHAT et al., 2013
112	10313	RTN3	TRIPHAT et al., 2013
113	6424	SFRP4	TRIPHAT et al., 2013

114	81858	SHARPIN	TRIPHAT et al., 2013
115	64754	SMYD3	TRIPHAT et al., 2013
116	8470	SORBS2	TRIPHAT et al., 2013
117	10174	SORBS3	TRIPHAT et al., 2013
118	6714	SRC	TRIPHAT et al., 2013
119	10847	SRCAP	TRIPHAT et al., 2013
120	6741	SSB	TRIPHAT et al., 2013
121	284297	SSC5D	TRIPHAT et al., 2013
122	25777	SUN2	TRIPHAT et al., 2013
123	4070	TACSTD2	TRIPHAT et al., 2013
124	6880	TAF9	TRIPHAT et al., 2013
125	7057	THBS1	TRIPHAT et al., 2013
126	374395	TMEM179B	TRIPHAT et al., 2013
127	7110	TMF1	TRIPHAT et al., 2013
128	7159	TP53BP2	TRIPHAT et al., 2013
129	11078	TRIOBP	TRIPHAT et al., 2013
130	51061	TXNDC11	TRIPHAT et al., 2013
131	53347	UBASH3A	TRIPHAT et al., 2013
132	10869	USP19	TRIPHAT et al., 2013
133	10493	VAT1	TRIPHAT et al., 2013
134	55737	VPS35	TRIPHAT et al., 2013
135	6293	VPS52	TRIPHAT et al., 2013
136	140612	ZFP28	TRIPHAT et al., 2013
137	9726	ZNF646	TRIPHAT et al., 2013
138	8694	DGAT1	CAMUS et al., 2013
139	22931	RAB18	SALLOUM et al., 2013
140	4296	MLK3 (MAP3K11)	AMAKO et al., 2013
141	10226	TIP47 (PLIN3)	PLOEN et al., 2013
142	3099	HK2	RAMIÈRE et al, 2014
143	55738	ARFGAP1	LI et al., 2014
144	192111	PGAM5	MEISTERMANN et al., 2014
145	64857	PKHG2 (PLEKHG2)	MEISTERMANN et al., 2014
146	23291	FBW1B	MEISTERMANN et al., 2014
147	9113	LATS1	MEISTERMANN et al., 2014
148	26524	LATS2	MEISTERMANN et al., 2014
149	3309	GRP78 (HSPA5)	JIANG et al., 2014
150	64746	ACBD3	HONG et al., 2014
151	1191	ApoJ (Clusterin)	LIN et al., 2014

152	1977	EIF4E	PANDA et al.,2014
153	3313	HSPA9	GERMAIN et al., 2014
154	55704	Girdin (CCDC88A)	GERMAIN et al., 2014
155	54583	EGLN1	GERMAIN et al., 2014
156	10075	HUWE1	GERMAIN et al., 2014
157	10916	MAGED2	GERMAIN et al., 2014
158	2773	GNAI3	GERMAIN et al., 2014
159	11218	DDX20	GERMAIN et al., 2014
160	440193	CCDC88C	GERMAIN et al., 2014
161	51365	PLA1A	GUO et al, 2015
162	56957	OTUD7B	SIANIPAR et al., 2015
163	1654	DDX3	WANG et al., 2015
164	4904	YB-1	WANG et al., 2015
165	8468	FKBP6	KASAI et al., 2015
166	6717	SRI	TRAN et al., 2015
167	23607	CMS (CD2AP)	IGLOI et al., 2015
168	10346	TRIM22	YANG et al., 2016
169	51280	GP73 (GOLM1)	ZHANG et al,. 2016
170	27141	CIDEB	CAI et al., 2016
171	51246	SCOTIN (SHISA5)	KIM et al., 2016
172	5777	SHP1 (PTPN6)	CONTI et al., 2016
173	9830	TRIM14	WANG et al., 2016
174	84961	FBXL20	HAN et al., 2016
175	2549	GAB1	HAN et al., 2016
176	3543	IGLL1	HAN et al., 2016
177	8717	TRADD	HAN et al., 2016
178	4615	MYD88	HAN et al., 2016
179	5524	PPP2R4	HAN et al., 2016
180	1017	CDK2	HAN et al., 2016
181	338	APOB	HAN et al., 2016
182	27063	ANKRD1	THAN et al., 2016
183	10139	ARFRP1	LIM et al., 2016
184	1119	hCKα (CHKA)	WONG, CHEN et al., 2016
185	79626	TIPE2 (TNFAIP8L2)	WANG et al., 2016
186	27183	VPS4A	BAROUCH-BENTOV et al., 2016
187	9146	HRS (HGS)	BAROUCH-BENTOV et al., 2016
188	3429	ISG12a (IFI27)	XUE et al., 2016
189	5036	EBP1 (PA2G4)	MISHRA et al., 2017

190	27242	DR6 (TNFRSF21)	LUONG et al., 2017
191	55611	OTUB1	VLAICU et al., 2017
192	3093	UBE2K	VLAICU et al., 2017
193	23011	Rab21	VLAICU et al., 2017
194	25781	RAB3GAP2	VLAICU et al., 2017
195	123	PLIN2	VLAICU et al., 2017
196	255738	PCSK9	LI, LIU et al., 2018
197	4600	MxB (Mx2)	Yi et al., 2018
198	10635	RAD51AP1	NGUYEN et al., 2019
199	10128	LRPPRC	REFOLO et al., 2019
200	92597	MOB1B	REFOLO et al., 2019
201	9588	Peroxiredoxin 1 (PRDX6)	REFOLO et al., 2019
202	7429	Villin-1 (VIL1)	REFOLO et al., 2019
203	1627	Drebin-1 (DBN1)	REFOLO et al., 2019
204	4676	NAP1L4	REFOLO et al., 2019
205	1650	OST48 (DDOST)	REFOLO et al., 2019
206	6184	Ribophorin I (RPN1)	REFOLO et al., 2019
207	7184	HSP90B1	REFOLO et al., 2019
208	23344	FAM62A (ESYT1)	REFOLO et al., 2019
209	2222	Squalene synthase (FDFT1)	REFOLO et al., 2019
210	4430	Miosina - Ib (MYO1B)	REFOLO et al., 2019
211	2597	GAPDH	REFOLO et al., 2019
212	10399	Rack1	LEE et al., 2019
213	570	Baat	LEE et al., 2019
214	1508	CTSB	LEE et al., 2019
215	79763	ISOC2	LEE et al., 2019
216	27338	UBE2S	PHAM et al., 2019
217	282616	IL28A (IFNL2)	MA et al., 2020
218	11252	PACSIN2	NGUYEN et al., 2020a
219	2017	CTTN	NGUYEN et al., 2020b
220	3927	LASP-1	CHOI et al., 2020
221	10768	AHCYL1	LIN et al., 2021

Tabela 1– Interações da proteína NS5A do vírus da hepatite C com proteínas do hospedeiro humano descritas na literatura.

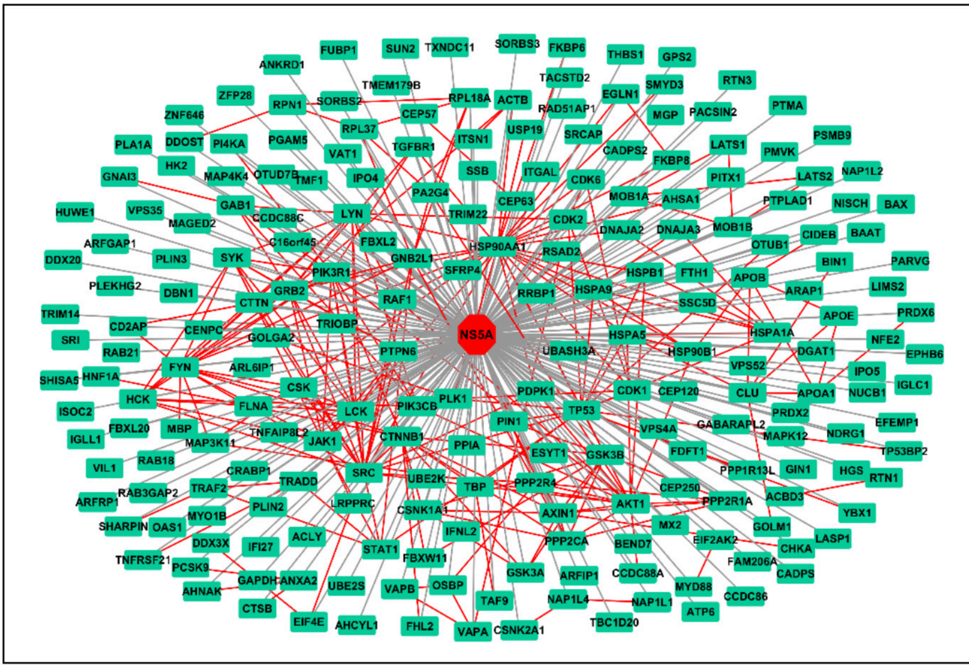
4.2 Redes de interação e análise topológica

Foram recuperadas 229 interações físicas de alta confiança entre as 220 proteínas do hospedeiro (99,55% das proteínas da nossa lista) pela plataforma STRING. Com a análise da estatística de rede gerada pela plataforma observamos que as proteínas que interagem com NS5A formam uma rede de interações físicas com 220 nós e 229 arestas que possui uma quantidade significativa de interações ($p<1.0$ e-16). Este dado indica que as proteínas estão conectadas, pelo menos parcialmente, como um grupo biológico. Também obtivemos outros dados da análise de rede de interação das proteínas humanas feita pela plataforma STRING que são mostrados na Tabela 2: a média de conexões das proteínas e a média do coeficiente de agrupamento local de cada proteína.

NOME	VALOR
Número de nós	220
Número de arestas	229
Média de conexões das proteínas	2,08
Média do coeficiente de agrupamento local de cada proteína	0,355
Número esperado de arestas	101
p-valor do enriquecimento de PPI	< 1.0 e-16

Tabela 2 – Dados da análise da rede de interação da plataforma STRING.

Após recuperarmos as PPI das proteínas encontradas em nosso levantamento bibliográfico, construímos uma rede de PPI através do programa Cytoscape 3.8.2 com interações entre NS5A e proteínas do hospedeiro mais as interações físicas conhecidas entre proteínas humanas obtidas da plataforma STRING, contendo 222 nós e 450 arestas. Os 222 nós são as 221 proteínas do hospedeiro mais a proteína viral NS5A. As 450 arestas são as interações entre proteínas humanas mais as interações de NS5A com as proteínas do hospedeiro humano (Figura 1). Redes de PPIs vírus-hospedeiro construidas com PPIs humanas são representações gráficas que nos auxiliam na compreensão de mecanismos moleculares pela qual um vírus perturba as vias celulares do hospedeiro. Além disso, auxiliam no entendimento do papel das proteínas humanas na patogênese viral, como foi realizado por estudos de rede de interação da proteína NS5A (TRIPATHI et al., 2013) e estudos que englobavam mais proteínas do HCV (CHASSEY et al., 2008; GERMAIN, et al., 2014; HAN, et al., 2016).



Nós (em verde): proteínas humanas que interagem com NS5A. Nós (em vermelho): proteína NS5A do HCV. Arestas (em cinza): interações NS5A-hospedeiro. Arestas (em vermelho): interações conhecidas entre proteína humanas.

Figura 1 – Rede de interação da proteína NS5A do vírus da hepatite C com proteínas humanas.

Fonte – O autor (2021).

Para identificar as principais proteínas na rede de interação de NS5A realizamos uma análise topológica que permitiu ranquear as proteínas segundo a sua medida de *betweenness*, e assim, definir gargalos em nossa rede de interação (Tabela 3). Alguns estudos demonstraram que o HCV interage preferencialmente com proteínas humanas com alto valor de *betweenness*, e estas proteínas podem atuar conectando os módulos celulares, sendo essenciais para a infecção (CHASSEY et al., 2008; GERMAIN, et al., 2014). No estudo realizado por TRIPATHI et al. (2013), foi descrito que proteínas com alto valor de *betweenness* possuem um papel crucial na infecção e patogênese do HCV, já que estas proteínas são centrais para uma rede de interação por possuírem uma grande quantidade de caminhos mínimos passando por elas. Assim, são mais proeminentes em controlar o fluxo da informação de uma rede. Neste mesmo estudo foram identificados 39 gargalos proteicos em uma rede de interação estendida que compreendia além de interações entre proteínas virais e do hospedeiro e as suas interações, várias outras proteínas do interatoma de proteínas humanas (HPI) que não interagem com NS5A. Vários destes gargalos foram igualmente descritos em nosso estudo, dentre eles CTNNB1 e PIK3R1, que são importantes proteínas que contribuem para o desenvolvimento de CHC.

Em nosso estudo foram encontrados 22 gargalos, 16 deles foram igualmente encontrados por TRIPATHI et al. (2013), enquanto 6 deles são novos, as proteínas: GNB2L1, CLU, PPP2R4, HSPA1A, APOB e HSPA5. Assim, encontramos 22 importantes proteínas proeminentes de serem centrais para a interação de NS5A com o hospedeiro humano.

NOME	DEGREE	BETWEENNESS
HSP90AA1	31	7,0965 E-3
TP53	18	2,1842 E-3
AKT1	18	1,9275 E-3
SRC	20	1,7002 E-3
FYN	17	1,1922E-3
CTNNB1	13	9,7627E-4
PIK3R1	14	7,2203E-4
GRB2	14	5,2793E-4
GSK3B	12	4,9842E-4
LYN	13	4,7790E-4
GNB2L1	10	4,3192E-4
AXIN1	11	3,7981E-4
JAK1	10	2,7839E-4
CLU	7	2,3995E-4
PPP2R4	8	2,2761E-4
STAT1	7	2,1024E-4
HSPA1A	8	1,7071E-4
LCK	12	1,6834E-4
APOB	6	1,3711E-4
HSPA5	7	1,3368E-4
PPP2CA	9	1,2477E-4
SYK	11	1,1859E-4

Tabela 3 – Proteínas da rede de interação da proteína NS5A elencadas do maior para o menor valor de *betweenness.*

4.3 Análise de enriquecimento funcional

Com a análise de enriquecimento funcional da rede de interação de NS5A realizada na plataforma STRING, foi obtido um total de 104 vias do KEGG significamente enriquecidas com FDR<0,01 (dados não mostrados). A análise de enriquecimento funcional de rede de interação para vias do KEGG é uma análise específica de vias celulares que vem sendo realizada por estudos de redes de interação para identificar como o HCV, através da proteína NS5A ou de outras proteínas, consegue perturbar as vias celulares humanas.

Em uma análise de rede de interação contendo todas as proteínas do HCV realizada por HAN et al. (2016) foi descoberto que a proteína NS5A promove a proliferação e metástase de células de CHC por meio da ativação da via AKT/GSK3B/β-catenina. Esta mesma via de sinalização, descrita no KEGG como via de sinalização Wnt, está enriquecida em nosso estudo (FDR = 0,0096), assim como outras vias relacionadas com o câncer como as vias de sinalização: JAK/STAT3, PI3K-AKT, MAPK, p53, Fc epsilon RI. No estudo realizado por TRIPATHI et al. (2013) foram encontradas 79 vias enriquecidas (FDR <0,01) e identificados gargalos nas proteínas observadas destas vias. Nosso estudo encontrou 104 vias enriquecidas distribuídas em 21 diferentes categorias do KEGG. Isso é consistente com o grande número de interações da proteína NS5A e demonstra a sua importância na perturbação das vias celulares do hospedeiro, o que pode causar diversas comorbidades associadas a hepatite C, como o CHC e distúrbios metabólicos.

Para identificar as vias do KEGG enriquecidas que podem estar relacionadas ao desenvolvimento de CHC, que é uma comorbidade associada a pacientes que desenvolvem hepatite C crônica, foram selecionadas as categorias do KEGG: "Transdução de sinal", "Câncer: visão geral", e "Câncer: tipo específico" que apresentaram várias vias significamentivamente enriquecidas. Identificamos os gargalos da rede de interação de NS5A presentes em cada via e estas estão mostradas em vermelho na coluna de proteínas observadas da Tabela 4.

CATEGORIA	VIAS DO KEGG	PROTEÍNAS OBSERVADAS	NÚMERO DE GARGALOS
3.2 Transdução de sinal	Via de sinalização de esfingolipídeos	MAPK12, TRAF2, RAF1, **TP53**, PIK3CB, BAX, PPP2R1A, TRADD, PDPK1, **FYN**, GNAI3, **PPP2CA**, **PIK3R1**, **AKT1**	5
	Via de sinalização de Hippo	**AXIN1**, FBXW11, PPP2R1A, **GSK3B**, **TP53**, **CTNNB1**, ACTB, TGFBR1, LATS2, MOB1A, MOB1B, **PPP2CA**, LATS1	5
	Via de sinalização FoxO	GABARAPL2, MAPK12, RAF1, CDK2, PIK3CB, PLK1, PDPK1, TGFBR1, **GRB2**, **PIK3R1**, **AKT1**	3
	Via de sinalização PI3K-Akt	RAF1, THBS1, CDK6, CDK2, **TP53**, PIK3CB, HSP90B1, PPP2R1A, **GSK3B**, **HSP90AA1**, **JAK1**, PDPK1, **SYK**, **GRB2**, **PPP2CA**, **PIK3R1**, **AKT1**	9
	Via de sinalização ErbB	RAF1, GAB1, PIK3CB, **GSK3B**, **SRC**, **GRB2**, **PIK3R1**, **AKT1**	5
	Via de sinalização rap1	MAPK12, RAF1, THBS1, PIK3CB, **CTNNB1**, ITGAL, ACTB, GNAI3, **SRC**, **PIK3R1**, **AKT1**	4
	Via de sinalização JAK-STAT	RAF1, PIK3CB, IFNL2, **JAK1**, **STAT1**, **GRB2**, PTPN6, **PIK3R1**, **AKT1**	5
	Via de sinalização MAPK	MAPK12, TRAF2, HSPB1, RAF1, **TP53**, MAP3K11, TRADD, FLNA, TGFBR1, **GRB2**, MYD88, **AKT1**	3
	Via de sinalização NF-kappa B	CSNK2A1, TRAF2, **LCK**, TRADD, **SYK**, MYD88, **LYN**	3

3.2 Transdução de sinal	Via de sinalização da Fosfolipase D	RAF1, GAB1, PIK3CB, **FYN**, **SYK**, **GRB2**, **PIK3R1**, **AKT1**	5
	Via de sinalização de Hippo - várias espécies	LATS2, MOB1A, MOB1B, LATS1	0
	Via de sinalização TNF	MAPK12, TRAF2, PIK3CB, TRADD, **PIK3R1**, PGAM5, **AKT1**	2
	Via de sinalização HIF-1	GAPDH, PIK3CB, HK2, EGLN1, **PIK3R1**, **AKT1**	2
	Via de sinalização mTOR	RAF1, PIK3CB, **GSK3B**, PDPK1, **GRB2**, **PIK3R1**, **AKT1**	4
	Via de sinalização Wnt	CSNK2A1, **AXIN1**, FBXW11, **TP53**, **GSK3B**, **CTNNB1**, SFRP4	4
6.1 Câncer: visão geral	Carcinogênese viral	EIF2AK2, TRAF2, DNAJA3, CDK6, CDK2, **TP53**, PIK3CB, BAX, TRADD, **JAK1**, **SRC**, **SYK**, TBP, **GRB2**, CDK1, DDX3X, **PIK3R1**, **LYN**	7
	Expressão PD-L1 e Via de *checkpoint* PD-1 no câncer	MAPK12, CSNK2A1, RAF1, PIK3CB, **LCK**, **JAK1**, **STAT1**, PTPN6, MYD88, **PIK3R1**, **AKT1**	5
	Proteoglicanos no câncer	MAPK12, RAF1, THBS1, GAB1, **TP53**, PIK3CB, PDPK1, **CTNNB1**, ACTB, FLNA, **SRC**, **GRB2**, PTPN6, **PIK3R1**, **AKT1**	6
	Vias do câncer	TRAF2, RAF1, **AXIN1**, CDK6, CDK2, **TP53**, PIK3CB, BAX, HSP90B1, **GSK3B**, **HSP90AA1**, **JAK1**, **CTNNB1**, **STAT1**, EGLN1, GNAI3, TGFBR1, **GRB2**, **PIK3R1**, **AKT1**	10
	Metabolismo de colina no câncer	RAF1, CHKA, PIK3CB, PDPK1, **GRB2**, **PIK3R1**, **AKT1**	4
	Metabolismo central de carbono no câncer	RAF1, **TP53**, PIK3CB, HK2, **PIK3R1**, **AKT1**	3
6.2 Câncer: tipo específico	Câncer endometrial	RAF1, **AXIN1**, **TP53**, PIK3CB, BAX, **GSK3B**, PDPK1, **CTNNB1**, **GRB2**, **PIK3R1**, **AKT1**	7
	Câncer de próstata	RAF1, CDK2, **TP53**, PIK3CB, HSP90B1, **GSK3B**, **HSP90AA1**, PDPK1, **CTNNB1**, **GRB2**, **PIK3R1**, **AKT1**	7
	Câncer colorretal	RAF1, **AXIN1**, **TP53**, PIK3CB, BAX, **GSK3B**, **CTNNB1**, TGFBR1, **GRB2**, **PIK3R1**, **AKT1**	7
	Carcinoma hepatocelular	RAF1, **AXIN1**, GAB1, CDK6, **TP53**, PIK3CB, BAX, **GSK3B**, **CTNNB1**, ACTB, TGFBR1, **GRB2**, **PIK3R1**, **AKT1**	7
	Câncer gástrico	RAF1, **AXIN1**, GAB1, CDK2, **TP53**, PIK3CB, BAX, **GSK3B**, **CTNNB1**, TGFBR1, **GRB2**, **PIK3R1**, **AKT1**	7
	Câncer de pâncreas	RAF1, CDK6, **TP53**, PIK3CB, BAX, **JAK1**, **STAT1**, TGFBR1, **PIK3R1**, **AKT1**	5
	Câncer de pulmão de células não pequenas	RAF1, CDK6, **TP53**, PIK3CB, BAX, PDPK1, **GRB2**, **PIK3R1**, **AKT1**	4
	Leucemia mielóide crônica	RAF1, CDK6, **TP53**, PIK3CB, BAX, TGFBR1, **GRB2**, **PIK3R1**, **AKT1**	4

6.2 Câncer: tipo específico	Câncer de mama	RAF1, **AXIN1**, CDK6, **TP53**, PIK3CB, BAX, **GSK3B**, **CTNNB1**, **GRB2**, **PIK3R1**, **AKT1**	7
	Glioma	RAF1, CDK6, **TP53**, PIK3CB, BAX, **GRB2**, **PIK3R1**, **AKT1**	4
	Via de sinalização VEGF	MAPK12, HSPB1, RAF1, PIK3CB, **SRC**, **PIK3R1**, **AKT1**	3
	Câncer de pulmão de células pequenas	TRAF2, CDK6, CDK2, **TP53**, PIK3CB, BAX, **PIK3R1**, **AKT1**	3
	Carcinoma de células renais	RAF1, GAB1, PIK3CB, EGLN1, **GRB2**, **PIK3R1**, **AKT1**	3
	Melanoma	RAF1, CDK6, **TP53**, PIK3CB, BAX, **PIK3R1**, **AKT1**	3
	Carcinoma basal celular	**AXIN1**, **TP53**, BAX, **GSK3B**, **CTNNB1**	4
	Leucemia mielóide aguda	RAF1, PIK3CB, **GRB2**, **PIK3R1**, **AKT1**	3
	Câncer de bexiga	RAF1, THBS1, **TP53**, **SRC**	2

Tabela 4 – Gargalos da rede de interação de NS5A presentes nas vias do KEGG.

Fonte – O autor (2021).

Através da interação com proteínas importantes para vias de transdução de sinal, incluindo os gargalos da rede de interação, que são proteínas centrais para o HCV, a proteína NS5A pode interferir em variados processos celulares gerando uma maior sobrevivência e proliferação celular, o que contribui para o desenvolvimento do CHC. Estudos anteriores já apontaram a influência da proteína NS5A em várias vias de transdução de sinal que medeiam funções celulares importantes no processo de carcinogênese que foram enriquecidas em suas análises, como as vias de sinalização JAK/STAT3, MAPK e Wnt por HAN et al. (2016), e as vias de sinalização MAPK e PI3K-Akt por TRIPATHI et al. (2013), que foram igualmente enriquecidas em nosso estudo.

O enriquecimento funcional das vias celulares gerais e específicas para diferentes tipos de câncer, bem como a presença de gargalos da rede de interação de NS5A, demonstram que a proteína NS5A interage e possui alvos proteicos presentes em importantes vias celulares já descritas por participarem do processo de carcinogênese induzida por vírus e outras vias gerais da carcinogênese, como a via do CHC. E isto está de acordo com o que foi citado por TRIPATHI et al. (2013) que alguns vírus interagem preferencialmente com fatores do hospedeiro relacionados ao câncer. Além disso, quando analisamos as proteínas presentes nestas vias, observamos que várias delas são gargalos para a rede de interação de NS5A. Isto é condizente com o fato de que 50% dos gargalos da rede de interação de NS5A (HSP90AA1, TP53, AKT1, SRC, CTNNB1, PIK3R1, LYN, AXIN1, JAK1, LCK e SYK) participam da lista de genes relacionados ao câncer descritos na plataforma COSMIC (*Catalogue of Somatic Mutations in Cancer*).

Ao analisarmos individualmente a via do CHC do KEGG observamos 14 proteínas que interagem com NS5A, sendo Axin1, TP53, GSK3B, CTNNB1, GRB2, PIK3R1 e AKT1, gargalos para a rede de interação de NS5A. As proteínas PI3K (PIK3R1 é uma subunidade de PI3K) e AKT1 atuam na regulação da via de sinalização PI3K-AKT, e as proteínas Axin1, CTNNB1 (β-catenina) e GSK3B são importantes para a via de sinalização Wnt. Já foi demostrado que a proteína NS5A pode interagir com estas vias gerando proliferação celular e inibição da apoptose, o que contribui para o CHC (IRSHAD, et al. 2017). Além disso, estas vias atuam na regulação do processo de fibrogênese hepática, que é um dos processos patológicos gerados com a infecção pelo HCV associados com o desenvolvimento de CHC (IRSHAD, et al. 2017).

A proteína p53 (TP53) é importante para a manutenção da integridade genômica, por ser um indutor de apoptose mediante dano ao DNA. Foi descrito por LAN, et al. (2002) que a proteína NS5A pode interagir com p53 inibindo a sua atividade de transativação transcricional, o que pode contribuir para o desenvolvimento de CHC na infecção crônica pelo HCV.

Um estudo recente demostrou que a regulação da proteína GRB2 pode aumentar o crescimento e metástase do CHC (LV, et al. 2020), sendo já descrito anteriormente que esta é uma importante proteína para a proliferação celular que contribui para a tumorigênese e progressão do câncer (GIUBELLINO, et al 2008). Desta forma, a interação de NS5A com GRB2 pode ser uma importante via pela qual o HCV contribui para o desenvolvimento do CHC que ainda não é compreendida.

Sendo assim, estudar esta rede de interação pode fornecer informações importantes da história natural da infecção pelo HCV e sua evolução para complicações que aumentam sua morbidade/mortalidade.

5 | CONCLUSÃO

A proteína NS5A do HCV possui uma grande quantidade de interações com proteínas humanas, e isto pode ser explicado por esta proteína viral possuir dois domínios desdobrados, que possuem uma certa flexibilidade estrutural, o que permite o reconhecimento por diferentes proteínas celulares. Foram encontrados 22 gargalos para rede de interação de NS5A. Destes, as proteínas: GNB2L1, CLU, PPP2R4, HSPA1A, APOB e HSPA5 ainda não foram descritas na literatura como gargalos. Através da interação com estas proteínas centrais para a infecção viral, o HCV perturba várias vias celulares, incluindo vias relacionadas ao CHC. Ao analisar os 7 gargalos presentes na via do CHC observamos importantes proteínas já descritas por estarem associadas à hepatocarcinogênese induzida pelo HCV, as proteínas: AXIN1, TP53, GSK3B, CTNNB1, PIK3R1 e AKT1. Embora também contribua para a hepatocarcinogênese, ainda não foi descrito algum mecanismo pela qual a proteína NS5A possa induzir o CHC através da sua interação com a proteína GRB2.

Desta forma, a interação de NS5A com GRB2 pode ser um importante via pela qual o HCV contribui para o desenvolvimento do CHC que ainda não é compreendida.

REFERÊNCIAS

1. AMAKO, Y. et al. **Hepatitis C Virus NS5A Inhibits Mixed Lineage Kinase 3 to Block Apoptosis**. Journal of Biological Chemistry, v. 288, n. 34, p. 24753-24763, ago. 2013. doi:10.1074/jbc.M113.491985.

2. AMAKO, Y. et al. **Role of Oxysterol Binding Protein in Hepatitis C Virus infection.** Journal of Virology, v. 83, n. 18, p. 9237-9246, set. 2009. doi:10.1128/JVI.00958-09.

3. ARIMA, N. et al. **Modulation of Cell Growth by the Hepatitis C Virus Nonstructural Protein NS5A.** Journal of Biological Chemistry, v. 276, n. 16, p.12675-12684, abr. 2001. doi:10.1074/jbc.m008329200.

4. BAROUCH-BENTOV, R. et al. **Hepatitis C Virus Proteins Interact with the Endosomal Sorting Complex Required for Transport (ESCRT) Machinery via Ubiquitination To Facilitate Viral Envelopment.** MBio, v. 7, n. 6, nov. 2016. doi:10.1128/mbio.01456-16.

5. BARTENSCHLAGER, R. et al. **The molecular and structural basis of advanced antiviral therapy for hepatitis C virus infection**. Nature Reviews Microbiology, v. 11, n. 7, p. 482-496, jul. 2013. doi:10.1038/nrmicro3046.

6. BENJAMINI, Y. HOCHBERG, Y. 1995. **Controlling the False Discovery Rate: a Practical and Powerful Approach to Multiple Testing.** Journal of the Royal Statistical Society B, v. 57, p. 289-300, nov. 1995.

7. BÜRCKSTÜMMER, T. et al. **Raf-1 kinase associates with Hepatitis C virus NS5A and regulates viral replication.** FEBS Letters, v. 580, n. 2, p. 575-580, jan. 2006. doi:10.1016/j.febslet.2005.12.071.

8. CAI, H; et al. **Cell-death-inducing DFFA-like Effector B Contributes to the Assembly of Hepatitis C Virus (HCV) Particles and Interacts with HCV NS5A.** Scientific Reports, v. 6, n. 27778, jun. 2016. doi:10.1038/srep27778.

9. CAMUS, G. et al. **Diacylglycerol Acyltransferase-1 Localizes Hepatitis C Virus NS5A Protein to Lipid Droplets and Enhances NS5A Interaction with the Viral Capsid Core.** Journal of Biological Chemistry, v. 288, n. 14, p. 9915-9923, abr. 2013. doi:10.1074/jbc.M112.434910.

10. CHASSEY, B. **Hepatitis C virus infection protein network.** Molecular Systems Biology, Lyon, v. 4, nov. 2008. doi:10.1038/msb.2008.66.

11. CHATTERJI, U; et al. **HCV resistance to cyclosporin A does not correlate with a resistance of the NS5A–cyclophilin A interaction to cyclophilin inhibitors,** Journal of Hepatology. v. 53, n. 1, p. 50-56, jul. 2010. doi:10.1016/j.jhep.2010.01.041.

12. CHOI, J. W. et al. **Nonstructural NS5A Protein Regulates LIM and SH3 Domain Protein 1 to Promote Hepatitis C Virus Propagation.** Molecules and Cells. v. 43, n. 5, p. 469-478, maio. 2020. doi: 10.14348/molcells.2020.0018.

13. CHOI, S-H; HWANG, S. B. **Modulation of the Transforming Growth Factor-β Signal Transduction Pathway by Hepatitis C Virus Nonstructural 5A Protein.** Journal of Biological Chemistry, v. 281, n. 11, p. 7468-7478, jan. 2006. doi:10.1074/jbc.m512438200.

14. CHOI, Y-W. et al. **Proteomic approach identifies HSP27 as an interacting partner of the hepatitis C virus NS5A protein.** Biochemical and Biophysical Research Communications, v. 318, n. 2, p. 514-519, maio. 2004. doi:10.1016/j.bbrc.2004.04.052

15. CHUNG, Y-L. et al. **Hepatitis C virus NS5A as a potential viral Bcl-2 homologue interacts with Bax and inhibits apoptosis in hepatocellular carcinoma.** Int. J. Cancer, v. 107, n.1, p. 65-73. out. 2003. doi:10.1002/ijc.11303.

16. CONTI, B. et al**. Small heterodimer partner 1 directly interacts with NS5A viral protein and has a key role in HCV related liver cell transformation.** ONCOTARGET, v. 7, n. 51, p. 84575-84586, dez. 2016. doi: 10.18632/oncotarget.12144.

17. COSMIC. **Cancer Gene Census (CGC).** Disponível em: <https://cancer.sanger.ac.uk/census>. Acesso em: 03 de janeiro de 2022.

18. CYTOSCAPE 3.8.2. **Network Data Integration, Analysis, and Visualization in a Box.** Disponível em: <https://cytoscape.org/download.html> Acesso em: 15 de outubro de 2021.

19. GALE JR, M. J. et al. **Evidence That Hepatitis C Virus Resistance to Interferon Is Mediated through Repression of the PKR Protein Kinase by the Nonstructural 5A Protein.** VIROLOGY, v. 230 n. 2, p. 217-227, Jan. 1997.

20. GENEBRA. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Disponível em: <https://www.who.int/health-topics/hepatitis>. Acesso em: 02 nov. 2022.

21. GERMAIN, M. A. et al. **Elucidating Novel Hepatitis C Virus-Host Interactions Using Combined Mass Spectrometry and Functional Genomics Approaches.** Molecular & Cellular Proteomics, v. 13. n. 1, p.184-203, jan. 2014 doi:10.1074/mcp.M113.030155.

22. GHOSH, A. K. et al. **Modulation of interferon expression by hepatitis c virus ns5a protein and human homeodomain protein ptx1**. Virology, v. 306, n. 1, p. 51-59, fev. 2003 doi:10.1016/s0042-6822(02)00029-6.

23. GIUBELLINO, A. et al. **Grb2 Signaling in Cell Motility and Cancer.** Expert Opin Ther Targets. v. 12, n. 8, p. 1021-1033, ago. 2008. doi:10.1517/14728222.12.8.1021

24. GONZALEZ, O. et al. **The heat shock protein inhibitor Quercetin attenuates hepatitis C virus production**. HEPATOLOGY, v. 50, n. 6, p. 1756-1764, dez. 2009. doi:10.1002/hep.23232.

25. GUO, M; et al. **Phosphatidylserine-Specific Phospholipase A1 Involved in Hepatitis C Virus Assembly through NS2 Complex Formation**. Journal of Virology, v. 89. N. 4, p. 2367–2377. fev. 2015. doi:10.1128/JVI.02982-14.

26. HAMAMOTO, I. et al. **Human VAP-B Is Involved in Hepatitis C Virus Replication through Interaction with NS5A and NS5B.** Journal of Virology, v. 79, n. 21, p. 13473-13482, nov. 2005. doi:10.1128/JVI.79.21.13473-13482.2005.

27. HAN, Y. et al. **Hepatitis C Virus Protein Interaction Network Analysis Based on Hepatocellular Carcinoma**. PLOS ONE, v. 11, n. 4, abr. 2016. doi:10.1371/journal.pone.0153882.

28. He, Y. et al. **Subversion of Cell Signaling Pathways by Hepatitis C Virus Nonstructural 5A Protein via Interaction with Grb2 and P85 Phosphatidylinositol 3-Kinase.** Journal of Virology, v. 76, n. 18, p. 9207-9217, set. 2002. doi:10.1128/JVI.76.18.9207-9217.2002.

29. HELBIG, K. J. et al. **The antiviral protein viperin inhibits hepatitis C virus replication via interaction with nonstructural protein 5A**. Hepatology, v. 54, n. 5, p. 1506-1517, nov. 2011. doi:10.1002/hep.24542.

30. HONG, Z; et al. **Hepatitis C virus NS5A competes with PI4KB for binding to ACBD3 in a genotype-dependent manner.** Antiviral Research, v. 107, p. 50-55, Jul. 2014. doi:10.1016/j.antiviral.2014.04.012.

31. IGLOI, Z. et al. **The hepatitis C virus NS5A protein blocks EGFR degradation via a proline motif dependent interaction.** Journal of General Virology, v. 96, n. 8, p. 2133-2144, ago. 2015. doi:10.1099/vir.0.000145

32. INUBUSHI, S. et al. **Hepatitis C virus NS5A protein interacts with and negatively regulates the non-receptor protein tyrosine kinase Syk.** Journal of General Virology, v. 89, n. 5, p. 1231-1242. Maio, 2008. doi:10.1099/vir.0.83510-0.

33. IRSHAD, M. **Molecular basis of hepatocellular carcinoma induced by hepatitis C virus infection**. World J Hepatol. V. 9, n. 36, p. 1305-1314, dez, 2017. doi:10.4254/wjh.v9.i36.1305.

34. JIANG, J.; LUO, G. **Apolipoprotein E but Not B Is Required for the Formation of Infectious Hepatitis C Virus Particles.** Journal of Virology, v. 83, n. 24, p.12680-12691, dez. 2009. doi:10.1128/JVI.01476-09.

35. JIANG, X; et al. **Hepatitis C Virus Nonstructural Protein 5A Inhibits Thapsigargin-Induced Apoptosis**. PLOS ONE, v. 9, n. 11, nov. 2014. doi:10.1371/journal.pone.0113499.

36. KASAI, H. et al. **Involvement of FKBP6 in hepatitis C virus replication.** Scientific Reports, v. 5, n. 16699. 2015. doi:10.1038/srep16699.

37. KIM, N; et al. **Interferon-inducible protein SCOTIN interferes with HCV replication through the autolysosomal degradation of NS5A**. Nature Communications, v. 7, n. 10631, fev. 2016. doi:10.1038/ncomms10631.

38. Lan, K. H. et al. **HCV NS5A interacts with p53 and inhibits p53-mediated apoptosis**. Nature, p. 21, n. 31, p. 4801-4811, abr. 2022. doi:10.1038/sj.onc.1205589.

39. LAN, K. H. et al. **HCV NS5A inhibits interferon-α signaling through suppression of STAT1 phosphorylation in hepatocyte-derived cell lines.** Journal of Hepatology, v. 46, n. 5, p. 759-767, maio, 2007. doi:10.1016/j.jhep.2006.11.013.

40. LAN, K-H. et al. **HCV NS5A interacts with p53 and inhibits p53-mediated apoptosis.** Oncogene. V. 21, p. 4801-4811, jul, 2002.

41. LEE, J. S. et al. **RACK1 mediates rewiring of intracellular networks induced by hepatitis C virus infection.** PLOS Pathogens, v. 15, n. 9, set, 2019. doi:10.1371/journal.ppat.1008021

42. Li, H. C. et al. **Hepatitis C Viral Replication Complex.** Viruses, v. 13, n. 3, p. 520, Mar. 2022. doi:10.3390/v13030520.

43. LI, H. et al. **Hepatitis C Virus NS5A Hijacks ARFGAP1 To Maintain a Phosphatidylinositol 4-Phosphate-Enriched Microenvironment**. Journal of Virology, v. 88, n. 11, p. 5956-5966, jun. 2014. doi:10.1128/JVI.03738-13.

44. LI, Z; LIU, Q. **Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 inhibits hepatitis C virus replication through interacting with NS5A**. Journal of General Virology, v. 99, n. 1, p. 44-61, jan. 2018. doi:10.1099/jgv.0.000987

45. LIM, Y. S. et al. **ADP-ribosylation Factor-related Protein 1 Interacts with NS5A and Regulates Hepatitis C Virus Propagation.** Scientific Reports, v. 6, n. 31211, ago, 2016. doi:10.1038/srep31211.

46. LIM, Y.S. et al. **Peptidyl-Prolyl Isomerase Pin1 Is a Cellular Factor Required for Hepatitis C Virus Propagation**. Journal of Virology, v. 85, n. 17, p. 8777–8788, set. 2011. doi:10.1128/JVI.02533-10.

47. LIM, Y.S.; HWANG, S. B. **Hepatitis C Virus NS5A Protein Interacts with Phosphatidylinositol 4-Kinase Type III and Regulates Viral Propagation**. Journal of Biological Chemistry, v. 286, n. 13, p. 11290-11298, abr. 2011. doi:10.1074/jbc.M110.194472.

48. LIN, C. C. et al. **Apolipoprotein J, a glucose-upregulated molecular chaperone, stabilizes core and NS5A to promote infectious hepatitis C virus virion production**. Journal of Hepatology, v. 61, n. 5, p. 984-993, nov. 2014. doi:10.1016/j.jhep.2014.06.026

49. LIN, Y. S. et al. **Adenosylhomocysteinase like 1 interacts with nonstructural 5A and regulates hepatitis C virus propagation**. Journal of Microbiology, v. 59, n. 1. p. 101-109, jan. 2021. doi: 10.1007/s12275-021-0470-8.

50. LUONG, T. T. D. et al. **Hepatitis C Virus Exploits Death Receptor 6-mediated Signaling Pathway to Facilitate Viral Propagation**. Scientific Reports, v. 7, n. 1, jul. 2017. doi:10.1038/s41598-017-06740-9.

51. LV, J. et al. **Deubiquitinase PSMD14 enhances hepatocellular carcinoma growth and metastasis by stabilizing GRB2**. CANCER LETTERS. v. 469, p. 22-34, jan. 2020.

52. MA, Y. et al. **IL28A protein homotetramer structure is required for autolysosomal degradation of HCV-NS5A in vitro**. Cell Death & Disease, v. 11, n. 3, mar. 2020. doi:10.1038/s41419-020-2400-9.

53. MACDONALD, A. et al. **The hepatitis C virus NS5A protein binds to members of the Src family of tyrosine kinases and regulates kinase activity**. Journal of General Virology, v. 85. n. 3, p. 721-729. mar. 2004 doi:10.1099/vir.0.19691-0.

54. MANNS, M. P. et al. **Hepatitis C virus infection**. **N**ature Reviews Disease Primers, Hannover, v. 3, p.17006-17025, mar. 2017. doi:10.1038/nrdp.2017.6.

55. MATSUI, C. et al. **Hepatitis C Virus Infection Suppresses GLUT2 Gene Expression via Downregulation of Hepatocyte Nuclear Factor 1.** Journal of Virology, v. 86, n. 23, p. 12903-12911, dez. 2012. doi:10.1128/JVI.01418-12.

56. MEISTERMANN, H. et al. **A Novel Immuno-Competitive Capture Mass Spectrometry Strategy for Protein–Protein Interaction Profiling Reveals That LATS Kinases Regulate HCV Replication Through NS5A Phosphorylation.** Molecular & Cellular Proteomics, v. 13, n. 11, p. 3040-3048, nov. 2014. doi:10.1074/mcp.m113.028977.

57. MILWARD, A. et al. **Hepatitis C virus NS5A protein interacts with β-catenin and stimulates its transcriptional activity in a phosphoinositide-3 kinase-dependent fashion**. Journal of Virology, v. 91, n, 2. p. 373-381, fev. 2010. doi:10.1099/vir.0.015305-0.

58. MISHRA, P; et al. **Modulation of HCV replication and translation by ErbB3 binding protein1 isoforms**. Virology, v. 500, p. 35-49, jan. 2017. doi:10.1016/j.virol.2016.10.006

59. NGUYEN, L. P et al. **Cortactin Interacts with Hepatitis C Virus Core and NS5A Proteins: Implications for Virion Assembly**. Journal of Virology, v. 94, n. 19, set. 2020b. doi:10.1128/jvi.01306-20.

60. NGUYEN, L. P. et al. **PACSIN2 Interacts with Nonstructural Protein 5A and Regulates Hepatitis C Virus Assembly.** Journal of Virology, v. 94, n. 5, fev. 2020a. doi:10.1128/JVI.01531-19.

61. NGUYEN, T. T. et al. **Nonstructural 5A impairs DNA damage repair: Implication of hepatitis C virus-mediated hepatocarcinogenesis.** Journal of Virology, v. 92. n. 11, maio. 2018. doi:10.1128/JVI.00178-18

62. PANDA, S. et al. **A unique phosphorylation-dependent eIF4E assembly on 40S ribosomes co-ordinated by hepatitis C virus protein NS5A that activates internal ribosome entry site translation.** Biochemical Journal, v. 462, n. 2, p. 291-302, set. 2014. doi:10.1042/BJ20131530.

63. Park, K.-J. et al**. Hepatitis C Virus NS5A Protein Modulates c-Jun N-terminal Kinase through Interaction with Tumor Necrosis Factor Receptor-associated Factor 2**. Journal of Biological Chemistry, v. 278, n. 33, p. 30711-30718, jun. 2003. doi:10.1074/jbc.M209623200.

64. PHAM, H. T. et al. **Hepatitis C virus downregulates ubiquitin conjugating enzyme E2S expression to prevent proteasomal degradation of NS5A, leading to host cells more sensitive to DNA damage**. Journal of Virology, v. 93, n. 2, jan. 2019. doi:10.1128/JVI.01240-18.

65. PLOEN, D. et al. **TIP47 plays a crucial role in the life cycle of hepatitis C virus.** Journal of Hepatology, v. 58, n. 6, p. 1081-1088, jun. 2013. doi:10.1016/j.jhep.2013.01.022.

66. QADRI, I. et al. **Hepatitis C virus NS5A protein binds TBP and p53, inhibiting their DNA binding and p53 interactions with TBP and ERCC3.** Elsevier, v. 1592, n. 2, 193-204, Jul. 2002. doi:10.1016/s0167-4889(02)00315-

67. QUINTAVALLE, M. et al. **Hepatitis C Virus NS5A Is a Direct Substrate of Casein Kinase I-α, a Cellular Kinase Identified by Inhibitor Affinity Chromatography Using Specific NS5A Hyperphosphorylation Inhibitors.** Journal of Biological Chemistry, v. 282, n. 8, p. 5536-5544, fev. 2007. DOI 10.1074/jbc.M610486200.

68. RAMIERE, C. et al. **Activity of Hexokinase Is Increased by Its Interaction with Hepatitis C Virus Protein NS5A**. Journal of Virology, v. 88, n. 6, p. 3246-3254, mar. 2014. doi:10.1128/jvi.02862-13.

69. REFOLO, G. et al. **Negative regulation of MAVS-mediated antiviral signaling by the mitochondrial protein LRPPRC during HCV infection.** Hepatology, v. 69, n. 1, p. 39-50, jan. 2019. doi:10.1002/hep.30149.

70. REYES, G R. **The nonstructural NS5A protein of hepatitis C virus: An expanding, multifunctional role in enhancing hepatitis C virus pathogenesis**. Journal Biomedical Science. v. 9, n. 3, p 187-197. jun. 2002. doi:10.1007/bf02256065

71. ROUDOT-THORAVAL, F. et al. **Epidemiology of hepatitis C virus infection.** Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology, v. 45, n. 3, p. 101596, maio. 2021. doi:10.1016/j.clinre.2020.101596.

72. SALLOUM, S. et al. **Rab18 Binds to Hepatitis C Virus NS5A and Promotes Interaction between Sites of Viral Replication and Lipid Droplets.** PLOS Pathogens, v. 9, n. 8. Ago. 2013. doi:10.1371/journal.ppat.1003513.

73. SHI. S. T. et al. **Hepatitis C Virus NS5A Colocalizes with the Core Protein on Lipid Droplets and Interacts with Apolipoproteins**. Virology, v. 292, n. 2, p. 198-210, jan, 2002. doi:10.1006/viro.2001.1225.

74. SIANIPAR, I. R. et al. **Physical and functional interaction between hepatitis C virus NS5A protein and ovarian tumor protein deubiquitinase 7B.** Microbiology and Immunology, v. 59, n. 8, p. 466-476, ago. 2015. doi:10.1111/1348-0421.12278.

75. SKLAN, E. H. et al. **TBC1D20 Is a Rab1 GTPase-activating Protein That Mediates Hepatitis C Virus Replication**. Journal of Biological Chemistry, v. 282, n. 50, p. 36354-36361, Jun. 2007. doi:10.1074/jbc.m705221200.

76. STRING. **Protein-Protein Interaction Networks Functional Enrichment Analysis.** Disponível em: <https://string-db.org/>. Acesso em: 04 de outubro de 2021.

77. TABATA, K. et al., **Hepatitis C Virus Replication**. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine, out. 2019. doi:10.1101/cshperspect.a037093

78. TAGUCHI, T. et al. **Hepatitis C virus NS5A protein interacts with 2',5'-oligoadenylate synthetase and inhibits antiviral activity of IFN in an IFN sensitivity-determining region-independent manner**. Journal of General Virology, v. 85, n. 4, p. 959-969, abr. 2004. doi:10.1099/vir.0.19513-0.

79. TAGUWA, S. et al**. Human Butyrate-Induced Transcript 1 Interacts with Hepatitis C Virus NS5A and Regulates Viral Replication**. Journal of Virology, v. 82, n. 6, p. 2631-2641, mar. 2008. doi:10.1128/JVI.02153-07.

80. TAN, S. L. et al. **NS5A, a nonstructural protein of hepatitis C virus, binds growth factor receptor-bound protein 2 adaptor protein in a Src homology 3 domain/ligand-dependent manner and perturbs mitogenic signaling.** Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 96, n. 10, p. 5533-5538, jan. 1999.

81. THAN, T. T. et al. **Ankyrin Repeat Domain 1 is Up-regulated During Hepatitis C Virus Infection and Regulates Hepatitis C Virus Entry.** Scientific Reports, v. 6, n. 1, fev. 2016. doi:10.1038/srep20819.

82. TRAN, G. V. Q. et al. **Nonstructural 5A Protein of Hepatitis C Virus Regulates Soluble Resistance-related Calcium-binding Protein Activity for Viral Propagation.** Journal of Virology**,** v. 90, n. 6, p. 2794-805 dez. 2015. doi:10.1128/JVI.02493-15.

83. TRIPATHI, L. P. et al. **Understanding the Biological Context of NS5A–Host Interactions in HCV Infection: A Network-Based Approach.** Journal of Proteome Research, Osaka, v.12, n. 6, p. 2537-2551. maio. 2013. doi:10.1021/pr3011217.

84. TU, H. et al. **Hepatitis C Virus RNA Polymerase and NS5A Complex with a SNARE-like Protein.** Virology, v. 263, n. 1, p. 30–41, jun. 1999. doi:10.1006/viro.1999.9893.

85. UVERSKY, V N. et al. **Intrinsically Disordered Proteins in Human Diseases: Introducing the D^2 Concept**. Annual Review of Biophysics, v. 37, n 1, p 215-246. fev. 2008. doi:10.1146/annurev.biophys.37.032807.125924

86. VLAICU, O. et al. **Novel replicons and trans-encapsidation systems for Hepatitis C Virus proteins live imaging and virus-host interaction proteomics.** Journal of Virological Methods, v. 246, p. 42-50. ago. 2017. doi:10.1016/j.jviromet.2017.04.009

87. WANG, S. et al. **TRIM14 inhibits hepatitis C virus infection by SPRY domain-dependent targeted degradation of the viral NS5A protein.** Scientific Reports, v. 6, n. 1, ago. 2016. doi:10.1038/srep32336.

88. WANG, W. T. et al. **YB-1 Stabilizes Hepatitis C Virus NS5A via Phosphorylation-Mediated Interaction with NS5A to Regulate Viral Propagation.** Journal of Virology, v. 89, n. 22, p.11584-602, nov. 2105. doi:10.1128/JVI.01513-15

89. WANG, Y. et al. **Hepatitis C virus promotes hepatocellular carcinogenesis by targeting TIPE2, a new regulator of DNA damage response.** Tumor Biology, v. 37, n. 11, p. 15265-15274, nov. 2016. doi:10.1007/s13277-016-5409-z

90. WESTBROOK, R. H.; Dusheiko, G. **Natural history of hepatitis C**. Journal of Hepatology, v. 61, n. 1, p. 58-68, fev. 2014. doi:10.1016/j.jhep.2014.07.012.

91. WONG, M. T; CHEN, S. S. **Human Choline Kinase-α Promotes Hepatitis C Virus RNA Replication through Modulating Membranous Viral Replication Complex Formation**. Journal of Virology, v. 90, n. 20, p. 9075-9095, set. 2016. doi:10.1128/JVI.00960-16.

92. XUE, B. et al. **ISG12a restricts hepatitis C virus infection through ubiquitination-dependent degradation pathway.** Journal of Virology, v. 90, n. 15, p. 6832-6845, jul. 2016. doi:10.1128/JVI.00352-16.

93. YANG, C. et al**. Interferon alpha (IFNα)-induced TRIM22 interrupts HCV replication by ubiquitinating NS5A.** Cellular and Molecular Immunology, p. 1-9. jan. 2016. doi:10.1038/cmi.2014.131.

94. Yi, D; et al. **Human MxB inhibits the replication of HCV**. Journal of Virology, v. 93. n. 1, dez. 2018. doi:10.1128/JVI.01285-18.

95. ZECH B. et al. **Identification and characterization of amphiphysin II as a novel cellular interaction partner of the hepatitis C virus NS5A protein.** Journal of General Virology, v. 84, n. 3, p. 555-56, Mar. 2003. doi:10.1099/vir.0.18801-0.

96. ZHANG, X. et al. **Golgi protein 73 facilitates the interaction of hepatitis C virus NS5A with apolipoprotein E to promote viral particle secretion.** Biochemical and Biophysical Research Communications, v. 479, n. 4, p. 683-689, set. 2016. doi:10.1016/j.bbrc.2016.09.152.

CAPÍTULO 6

PRINCIPAIS TÉCNICAS DE ENCAPSULAMENTO DE INGREDIENTES ALIMENTÍCIOS

Data de aceite: 03/07/2023

Dayane de Melo Barros
Doutora em Bioquímica e Fisiologia – Universidade Federal de Pernambuco – Pernambuco

Danielle Feijó de Moura
Doutora em Ciências Biológicas – Universidade Federal de Pernambuco – Pernambuco

Zenaide Severina do Monte
Doutora em Ciências Farmacêuticas – Universidade Federal de Pernambuco – Pernambuco

Amanda Nayane da Silva Ribeiro
Estudante de Mestrado em Nutrição, Atividade Física e Plasticidade Fenotípica – Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco – Pernambuco

Tamiris Alves Rocha
Doutora em Ciências Biológicas – Universidade Federal de Pernambuco – Pernambuco

Marllyn Marques da Silva
Doutora em Biotecnologia - Universidade Federal Rural de Pernambuco – Pernambuco

Taís Helena Gouveia Rodrigues
Estudante de Doutorado em Nutrição – Universidade Federal de Pernambuco – Pernambuco

Marcelino Alberto Diniz
Estudante de Mestrado em Ciências Farmacêuticas – Universidade Federal de Pernambuco – Pernambuco

Aluízio Alfredo da Silva Júnior
Bacharel em Nutrição – Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco – Pernambuco

Aralí da Costa Gomes
Mestra em Saúde Humana e Meio Ambiente – Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco – Pernambuco

Hélen Maria Lima da Silva
Mestra em Ciência e Tecnologia de Alimentos – Universidade Federal Rural de Pernambuco – Pernambuco

Uyara Correia de Lima Costa
Estudante de Mestrado em Ciências Farmacêuticas – Universidade Federal de Pernambuco – Pernambuco

Fabio Henrique Portella Corrêa de Oliveira
Doutor em Botânica – Universidade Federal Rural de Pernambuco – Pernambuco

Silvio Assis de Oliveira Ferreira
Doutor em Bioquímica e Fisiologia – Universidade Federal de Pernambuco – Pernambuco

Roberta de Albuquerque Bento da Fonte
Doutora em Nutrição – Universidade Federal de Pernambuco – Pernambuco

RESUMO: A encapsulação é uma tecnologia utilizada para a proteção e estabilidade dos componentes alimentícios funcionais. Dessa forma, o objetivo do estudo foi identificar evidências disponíveis na literatura sobre as principais técnicas de encapsulamento de ingredientes alimentícios utilizadas na indústria de alimentos. Para a pesquisa, realizou-se uma revisão integrativa de literatura e foram definidos os descritores (técnicas, encapsulamento, alimentos, compostos bioativos e indústria) para a localização dos estudos. Os critérios de inclusão foram: artigos científicos completos em português, publicados entre os anos de 2016 e 2020. Foram avaliados 4 artigos na íntegra e nenhum versou sobre a questão do estudo, o que evidencia a necessidade de serem desenvolvidas mais pesquisas sobre as técnicas de encapsulamento de ingredientes alimentícios utilizadas na indústria alimentícia.
PALAVRAS-CHAVE: Compostos bioativos. Encapsulamento. Indústria alimentícia. Revisão integrativa. Tecnologia.

ABSTRACT: Encapsulation is a technology used for the protection and stability of functional food components. Thus, the objective of the study was to identify evidence available in the literature on the main encapsulation techniques for food ingredients used in the food industry. For the research, an integrative literature review was carried out and the descriptors (techniques, encapsulation, food, bioactive compounds and industry) were defined for the location of the studies. Inclusion criteria were: complete scientific articles in portuguese, published between 2016 and 2020. Four articles were evaluated in full and none dealt with the study question, which highlights the need to develop more research on the encapsulation techniques of food ingredients used in the food industry.
KEYWORDS: Bioactive compounds. Encapsulation. Food industry. Integrative review. Technology.

INTRODUÇÃO

Na indústria de alimentos a encapsulação é uma técnica amplamente utilizada para proteger ingredientes alimentícios funcionais, uma vez que, esta técnica permite melhorar as propriedades do material encapsulado, reduz a volatilidade dos compostos, aumenta a estabilidade, protege as substâncias dos agentes atmosféricos e melhora a biodisponibilidade (NEDOVIC *et al*., 2011; SARABANDI; GHAREHBEGLOU; JAFARI, 2020; TIMILSENA *et al*., 2020; ZHENG; MCCLEMENTS, 2020; MALEKI; WOLTERING; MOZAFARI, 2022).

A encapsulação é um tecnologia pela qual um material bioativo ou mistura de materiais é revestido por outro material. É uma técnica que permite o revestimento de materiais sólidos, líquidos ou gasosos, formando cápsulas que podem liberar seus conteúdos a taxas controladas e em condições específicas (CHARVE; REINECCIUS, 2009). Rebello (2009) afirma que as cápsulas podem ser classificadas conforme o diâmetro como: macrocápsulas (>5000μm), microcápsulas (0,2-5000μm) e nanocápsulas (<0,2μm).

Quanto aos materiais que podem ser encapsulados para aplicação na indústria de alimentos, incluem-se, óleos, vitaminas, bases, ácidos, aminoácidos, minerais, corantes, enzimas e microrganismos (DESAI; JIN PARK, 2005). De acordo com Anson (2005) vários materiais podem ser utilizados como agentes encapsulantes para a obtenção de uma boa cobertura, estes agentes podem ser de origem natural (quitosana, goma arábia, ágar, alginato de sódio, etc.), semissintética (carboximetilcelulose de sódio, hidroxipropilcelulose, monoglicerol, diacilglicerol, etc.) e sintética (polímeros do ácido acrílico e copolímeros).

Os métodos de encapsulação são classificados em: físicos (gelificação iônica externa, extrusão, *spray drying*, liofilização, fluidos supercríticos, etc.), químicos (inclusão molecular, polimerização, etc.) e físico-químicos (coacervação simples ou complexa, gelificação iônica interna, lipossomas, emulsificação, etc.). No segmento de alimentos, um dos grandes desafios é escolher o método mais eficiente e adequado para a encapsulação dos compostos ativos (AZEREDO 2005). Com base nisso, o objetivo do estudo foi realizar uma revisão de literatura sobre as principais técnicas de encapsulamento de ingredientes alimentícios utilizadas na indústria de alimentos.

METODOLOGIA

A revisão integrativa é um método de revisão mais abrangente que permite reunir, avaliar e sintetizar o conhecimento produzido, resultante de diferentes abordagens metodológicas. As etapas para a elaboração da revisão integrativa estão descritas a seguir:

1.1 Identificação do tema e elaboração da pergunta de pesquisa

Para a elaboração da pergunta de pesquisa e definição dos descritores aplicados na busca dos artigos científicos foi utilizada a estratégia de PICO. A utilização dessa estratégia para definir a questão de pesquisa na condução de métodos de revisão possibilita a identificação de palavras-chave, que favorecem a localização de estudos primários relevantes na base de dados. Dessa forma, a questão de pesquisa delimitada foi: "Quais as principais técnicas de encapsulamento de ingredientes alimentícios utilizadas na indústria?".

1.2 Estratégia de busca na literatura e amostragem

Foram estabelecidas estratégias de busca na literatura e selecionadas na base de dados Periódicos CAPES. Utilizaram-se os seguintes descritores: técnicas, encapsulamento, alimentos, compostos bioativos e indústria (Tabela 1) e o operador booleano (operador lógico) “AND”. Os critérios de inclusão dos estudos primários delimitados para a presente revisão foram: artigos científicos completos em português, publicados entre os períodos de 2016 e 2020. Foram excluídas as publicações que não se enquadravam no nível de critérios definidos e que não atendessem ao objetivo do estudo.

Base de dados	Descritores em português
Periódicos CAPES	Técnicas Encapsulamento Alimentos Compostos bioativos Indústria

Tabela 1. Base de dados e descritores utilizados para a pesquisa.

1.3 Definição das informações que foram extraídas dos estudos selecionados

Foram utilizados instrumentos consolidados com o objetivo de reunir, organizar e sumarizar as informações de modo conciso, construindo bancos de dados de fácil acesso.

1.4 Avaliação dos estudos primários incluídos na revisão

Os dados obtidos em cada publicação foram analisados conforme o objetivo do estudo.

1.5 Análise e síntese dos resultados da revisão integrativa

Os resultados das publicações selecionadas nas bases de dados foram confrontados de forma imparcial.

1.6 Apresentação da revisão integrativa

Os principais resultados evidenciados da análise das publicações selecionadas são apresentados adiante.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a identificação dos artigos no portal Periódicos CAPES, obteve-se um total de 67 artigos na referida base de dados, entre os quais foram selecionados 4 conforme os critérios de inclusão (Tabela 2).

Descritores por cruzamento	Estudos identificados	Estudos Selecionados
Técnicas AND encapsulamento	53	4
Técnicas AND encapsulamento AND alimentos	8	0
Técnicas AND encapsulamento AND alimentos AND compostos bioativos	3	0
Técnicas AND encapsulamento AND alimentos AND compostos bioativos AND indústria	3	0
Total	67	4

Tabela 2. Cruzamento dos descritores no portal Periódicos CAPES.

Concluída a fase de identificação dos artigos, realizou-se a seleção entre os 4 artigos, por meio da leitura do título e resumo. Foram excluídos os artigos com duplicidade e os que não eram condizentes com o objetivo do estudo, resultando na seleção de 4 artigos para leitura na íntegra (Figura 1).

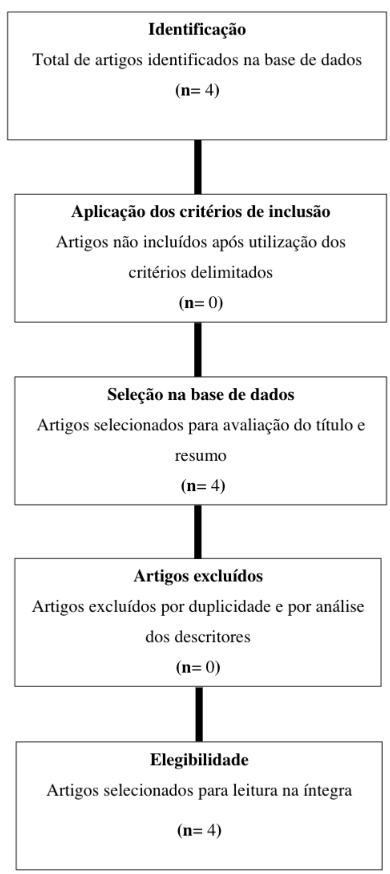


Figura 1. Fluxograma das etapas metodológicas utilizadas na revisão integrativa.

Com bases nos resultados obtidos, o estudo de revisão evidenciou que dos 4 artigos lidos na íntegra nenhum respondeu ao objetivo da pesquisa que foi realizar a identificação das principais técnicas de encapsulação de ingredientes alimentícios utilizadas na indústria, o que demonstra a necessidade do desenvolvimento de estudos atualizados a nível nacional sobre esta temática.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Na indústria de alimentos a encapsulação é uma técnica vastamente utilizada para melhorar a qualidade dos ingredientes alimentícios. O estudo de revisão não evidenciou achados científicos nacionais que abrangessem sobre a questão do estudo, o que demonstra a necessidade de serem desenvolvidas mais pesquisas científicas brasileiras acerca das principais técnicas de encapsulamento de ingredientes alimentícios utilizadas no setor industrial.

REFERÊNCIAS

ANSON, R. Microencapsulation: For enhanced textile performance. **Performance Apparel Markets**, v.12, p.21-39, 2005.

AZEREDO, H. M. C. Encapsulação: aplicação à tecnologia de alimentos. **Alimentos e Nutrição**, v. 16, n. 1, p. 89-97, 2005.

CHARVE, J; REINECCIUS, G. A. Encapsulation performance of proteins and traditional materials for spray dried flavors. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 57, n. 6, p. 2486-2492, 2009.

DESAI, K. G. H.; JIN PARK, H. Recent developments in microencapsulation of food ingredients. Drying technology, v. 23, n. 7, p. 1361-1394, 2005.

MALEKI, G; WOLTERING, E. J.; MOZAFARI, M. R. Applications of chitosan-based carrier as an encapsulating agent in food industry. **Trends in Food Science & Technology**, 2022.

NEDOVIC, V. *et al*. An overview of encapsulation technologies for food applications. Procedia food science, v. 1, p. 1806-1815, 2011.

REBELLO, F. F. P. Microencapsulação de ingredientes alimentícios. **Revista Agrogeoambiental**, v. 1, n. 3, p. 134-144, 2009.

SARABANDI, K.; GHAREHBEGLOU, P.; JAFARI, S. M. Spray-drying encapsulation of protein hydrolysates and bioactive peptides: Opportunities and challenges. **Drying Technology**, v. 38, n. 5-6, p. 577-595, 2020.

TIMILSENA, Y. P.*et al*. Encapsulation in the food industry: A brief historical overview to recent developments. **Food and Nutrition Sciences**, v. 11, n. 06, p. 481, 2020.

ZHENG, B.; MCCLEMENTS, D. J. Formulation of more efficacious curcumin delivery systems using colloid science: enhanced solubility, stability, and bioavailability. **Molecules**, v. 25, n. 12, p. 2791, 2020.

APLICAÇÕES BIOMÉDICAS DA CELULOSE BACTERIANA E QUITOSANA: UMA REVISÃO DE 10 ANOS

Data de submissão: 09/05/2023 *Data de aceite: 03/07/2023*

Ana Clara Quixabeira Carvalho
Instituto Federal do Tocantins
Araguaína-TO
http://lattes.cnpq.br/5542731792087059

Ana Beatriz Irene da Costa
Instituto Federal do Tocantins
Araguaína-TO
https://orcid.org/0009-0001-1339-6089

Izabella Thaís Bezerro Melo
Instituto Federal do Tocantins
Araguaína-TO
https://orcid.org/0009-0008-8053-2715

Katiane Pereira Braga
Instituto Federal do Tocantins
Araguaína-TO
http://lattes.cnpq.br/7345636118985954

Ricardo Barbosa de Sousa
Instituto Federal do Tocantins
Araguaína-TO
http://lattes.cnpq.br/7417235183974526

RESUMO: A utilização de biomateriais na medicina vem se tornando cada vez mais comum, dentre eles, os polímeros naturais quitosana e celulose bacteriana se destacam devido suas propriedades de biodegradação e biocompatibilidade em relação ao organismo. O principal objetivo deste artigo é apresentar uma revisão bibliográfica das principais aplicações de compósitos de quitosana e celulose bacteriana, na área da saúde, a partir de uma coletânea de dados pesquisados em artigos publicados nos periódicos *Scopus*, *Scielo* e mecanismo de pesquisa Google Acadêmico durante os anos de 2012 a 2022. As principais aplicações desses biomateriais na área da saúde são na medicina regenerativa, fabricação de curativos para feridas crônicas, tratamento de infecções bacterianas, feridas em geral e queimaduras, desenvolvimento de *scaffolds* para reparo de tecidos, biomateriais para diagnóstico de doenças e como carreadores de fármacos para sistemas de liberação controlada. O número de experimentos publicados nos últimos dez anos cresceu substancialmente, entretanto, é uma quantidade relativamente baixa, quando comparada com o cenário de possíveis aplicações e propriedades do compósito de celulose bacteriana e quitosana.

PALAVRAS-CHAVE: Biomedicina. Regeneração Tecidual. Polissacarídeos

BIOMEDICAL APPLICATIONS OF BACTERIAL AND CHITOSAN CELLULOSE: A 10-YEAR REVIEW

ABSTRACT: The use of biomaterials in medicine is becoming more common, among them, the natural polymers chitosan and bacterial cellulose stand out due to their biodegradation properties and biocompatibility with the organism. The main objective of this article is to present a bibliographic review of the main applications of composites of chitosan and bacterial cellulose, in the health area, from a collection of data researched in articles published in Scopus, Scielo and Google Scholar search engine during the years from 2012 to 2022. The main applications of these biomaterials in the health area are in regenerative medicine, manufacture of dressings for chronic wounds, treatment of bacterial infections, wounds in general and burns, development of scaffolds for tissue repair, biomaterials for diagnosing diseases and as drug carriers for controlled release systems. The number of experiments published in the last ten years has grown substantially, however, it is a relatively low amount, when compared with the scenario of possible applications and properties of the composite of bacterial cellulose and chitosan.
KEYWORDS: Biomedicine. Tissue Regeneration. Polysaccharides.

1 I INTRODUÇÃO

De acordo com Soares (2005), a utilização de biomateriais na medicina vem se tornando cada vez mais comum. Na literatura, o uso de biomateriais está em crescimento, sendo uma importante parte dos cerca de 300 mil produtos desenvolvidos para uso na área da saúde nos últimos 17 anos. Esses materiais destacam-se principalmente na produção de próteses e dispositivos médicos para diversas finalidades, sobressaindo-se por oferecerem a vantagem significativa de poderem ser decompostos e removidos após cumprirem sua função no organismo (ULERY; NAIR; LAURENCIN, 2011)**.** Ulery (2011) e Piskin (2012) relatam que esses compostos vêm sendo usados clinicamente como suturas cirúrgicas e implantes, fator este que vêm impulsionando o interesse de pesquisa por diferentes soluções na área da saúde, como controle de infecções, curativos, fabricação de produtos para tratamento de feridas e de dispositivos médicos.

Dentre os materiais utilizados para aplicações biomédicas, os polímeros são a classe mais versátil (PISKIN, 2012). Dentre eles, destaca-se a celulose bacteriana (CB), um biopolímero de origem microbiana, produzido extracelularmente por culturas bacterianas gram-negativas de diversos gêneros, dentre estes, o mais eficiente e estudado na síntese de CB é o *Komagataeibacter*, sobretudo a espécie *Komagataeibacter xylinus*, salienta Picheth et al. (2017). Ademais, a CB possui propriedades específicas, tais com a elevada capacidade de retenção e absorção de água, alta resistência mecânica, durabilidade, elasticidade e biocompatibilidade (AMORIM, 2020). Essas características têm gerado relevância na engenharia celular e tecidual como material para construção de *scaffolds* e para cirurgia reconstrutiva na condição de constituinte para reconstrução de defeitos cutâneos e como matriz para liberação de fármacos (KLEMM, et al., 2001; KHAN, et al.,

2022; PINHO et al., 2020; PARK et al, 2021).

Além disso, a celulose bacteriana é um material sustentável que, quando implantado, não causa reações no organismo devido sua biocompatibilidade, logo, em algumas aplicações, como na biomedicina, que requerem que o material seja bioativo, a CB pode ser difundida com outros materiais para fabricação de compósitos nos quais o outro componente tenha propriedades convenientes, conforme Fischer et. al (2017) e Ribeiro et al. (2022). Complementarmente a isto, inúmeras pesquisas surgem utilizando diferentes biopolímeros que atendam essa demanda, assim desfrutando de características específicas de outros compósitos que podem ser aplicadas em múltiplos campos da medicina, sobretudo na melhoria das propriedades antibacterianas da celulose bacteriana para a prevenção de infecções de feridas (MANEERUNG; TOKURA; RUJIRAVANIT, 2008).

Dentre os polímeros que podem melhorar os aspectos falhos da CB, têm se dado atenção a polímeros naturais, tais como a quitosana (CH), um polissacarídeo catiônico obtido pela desacetilação de unidades monoméricas da quitina, encontrada em animais invertebrados marinhos, insetos, fungos e leveduras, se destacando por ser um dos biopolímeros mais abundantes encontrados na natureza, perdendo apenas para a celulose (AZEVEDO et al., 2007). Nos últimos anos, biomateriais originados da quitosana, são empregados em diversos mecanismos, tais como regeneração tecidual,, dispositivos de liberação controlada de fármacos e imobilização de células em gel, além da veiculação de medicamentos, bem como na engenharia de tecidos aplicada à odontologia e diversas áreas médicas, sejam estes agregados ou separados da celulose bacteriana (D’AYALA; et al., 2008).

O objetivo do presente trabalho constitui apresentar uma coletânea de dados sobre as aplicações da celulose bacteriana e quitosana na área da saúde, sejam estas agregadas, modificadas ou associadas na forma de biomateriais, por meio de buscas em diferentes bases de periódicos científicos, nos últimos dez anos (2012-2022).

2 | METODOLOGIA

Os mecanismos de pesquisa para coleta de dados foram realizados com base em artigos científicos durante os anos de 2012 até meados de 2022. As fontes utilizadas para o embasamento teórico foram pesquisadas nos periódicos das bases *Scopus*, *Scielo* e o mecanismo de pesquisa Google Acadêmico. Dentre os biopolímeros e nanopartículas escolhidos, foram selecionados os principais materiais aplicados na biomedicina e medicina, utilizando as seguintes palavras-chave sobretudo na língua inglesa: “*chitosan*”; “*bacterial cellulose*”; “*biomedicine*”; “*chitosan*” AND “*bacterial cellulose*”. Posteriormente, foram escolhidas as principais aplicações com maior número de artigos científicos dentre as publicações nos periódicos, em todos os idiomas encontrados. Artigos sobre aplicações biomédicas de compósitos de celulose bacteriana e quitosana fora do prazo de 2012-2022,

que não pertencem aos periódicos citados e não atenderam ao seu objetivo proposto foram descartados. As buscas dos artigos científicos foram realizadas em setembro de 2022.

3 I RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na última década, a celulose bacteriana, juntamente com os biomateriais originados da quitosana tem recebido considerável atenção em todo o mundo, por serem empregados em diversos campos da biomedicina. Partindo de uma pesquisa nas bases de periódicos *Scopus*, *Scielo*, e o mecanismo de pesquisa Google Acadêmico, o fato citado acima pode ser observado. A partir da busca, foram selecionadas as aplicações biomédicas de compósitos de CB-CH com maior número de publicações, a quais resultaram-se de uma busca a partir das palavras-chave "*chitosan*" AND "*bacterial cellulose*" AND "*biomedicine*" OR "*medicine*". Ao final da seleção, seus métodos de síntese e resultados foram analisados, como mostrado na Tabela 1.

Aplicações biomédicas	Método de síntese	Resultados	Autores
Curativo para feridas crônicas	Hidrogéis	O compósito de celulose bacteriana (CB) e quitosana (CH) apresentou melhores características de curativo: maior porosidade, maior absorção de fluido da ferida e migração mais rápida das células (cicatrização *in vitro*). Todos os resultados obtidos confirmaram que os hidrogéis compostos se mostraram promissores agentes de cicatrização de feridas crônicas.	(ZMEJKOSKI *et al.*, 2021).
Desenvolvimento de *scaffolds* para diagnóstico de doenças	*Scaffolds*	A análise do experimento revelou uma forte interação célula-*scaffold*. A biocompatibilidade melhorada, a não toxicidade e a estrutura 3D do *scaffold* fabricado de CB-CH justificam suas potenciais aplicações no diagnóstico de câncer de ovário *in vivo*.	(UL-ISLAM, 2019).
Medicina regenerativa de tecidos e tratamento de feridas e queimaduras	Membranas	Os exames histológicos revelaram que as feridas tratadas com CB-CH epitelizam e se regeneram mais rapidamente do que aquelas tratadas apenas com CB.	(LIN *et al*, 2013)
Carreadores de fármacos	Filmes	O compósito de CB-CH foi preparado para alcançar a liberação controlada de sal de sódio de ibuprofeno (IbuNa) como fármaco modelo. Obteve-se como resultado a decrescente taxa de liberação de IbuNa para todos os filmes à medida que a concentração de CB foi aumentada na composição dos filmes, sendo a diminuição maior para os filmes multicamadas.	(PAVALOUI *et al .,* 2014)
Tratamento de infecções	Hidrogéis e membranas	Os hidrogéis compostos de CB-CH são biocompatíveis com excelente potencial antibiofilme com até 90% de redução do biofilme viável e até 65% de redução da altura do biofilme.	(ZMEJKOSKI *et al.*, 2021)

Tabela 1 - Aplicações biomédicas na área da saúde de compósitos de celulose bacteriana e quitosana.

Fonte: Autoria própria (2022).

Em análise, Frykberg e Banks (2015) relatam que as feridas crônicas são um desafio para os profissionais de saúde, por isso acabam por consumir uma grande quantidade de recursos de saúde em todo o mundo, se fazendo necessário o uso de novas tecnologias que supram essa necessidade. Dentre estas doenças, as mais comuns são a úlcera por pressão, a úlcera do pé diabético e a úlcera arteriovenosa, por isso surge a urgência de tratá-las com melhor eficiência**.**

No estudo de Zmejkoski et al. (2021), centrado no desenvolvimento de curativo para feridas crônicas na forma de hidrogéis e membranas, obtiveram-se resultados promissores do experimento, os quais indicaram que as membranas mantiveram teores de umidade adequados por um longo período sem desidratação, onde a resistência à tração e o alongamento na ruptura para compósito de celulose bacteriana e quitosana (CB-CH) se mostraram ligeiramente menores, e não apresentaram citotoxicidade onde o compósito de CB-CH apresentou melhores características de curativo: maior porosidade, maior absorção de fluido da ferida e migração mais rápida das células.

Ainda no tratamento de ferimentos, por meio de imersão de celulose bacteriana em quitosana seguida de liofilização, Zmejkoski et al. (2021) também produziram compósitos de CB-CH contra bactérias que prejudicam a cicatrização de feridas.

De acordo com o *National Institute of Health* (EUA), entre todas as infecções microbianas e crônicas, 65% e 80%, respectivamente, estão associadas à formação de biofilme de bactérias (JAMAL et al., 2017).

No estudo de Zmejkoski et al. (2021), aplicado na área de curativos para feridas crônicas, foi analisado o potencial de hidrogéis compostos de celulose bacteriana e quitosana de baixo peso molecular obtidas por irradiação gama. Por apresentarem maior rugosidade média da superfície, os hidrogéis mostraram-se biocompatíveis com excelente potencial anti-biofilme de bactérias com até 90% de redução do biofilme viável, onde os efeitos de BC e BC-CH na cicatrização de feridas cutâneas foram avaliados por modelos de ratos, em que exames histológicos revelaram que as feridas tratadas com CB-CH epitelizam e se regeneram mais rapidamente do que aquelas tratadas com CB.

A celulose bacteriana surge como um material versátil para a área biomédica devido às suas múltiplas características, dentre elas estruturais, físico-químicas, mecânicas e biológicas (UL-ISLAM, 2019). Nas aplicações voltadas ao cultivo de células, o experimento de Ul-Islam (2019) teve como objetivo fabricar *scaffolds* 3D de celulose bacteriana e quitosana através de uma impregnação de solução *ex situ* e a partir da análise a interação do *scaffold* com as linhas celulares de câncer de ovário, resultados que alcançaram sua proposta de pesquisa, os quais apresentaram biocompatibilidade melhorada, a não toxicidade e a estrutura 3D do scaffold fabricado de CB-CH, o que justifica suas potenciais aplicações no diagnóstico de câncer de ovário *in vivo.*

Os sistemas de liberação controlada de medicamentos tem como objetivo manter a redução de efeitos colaterais e concentração dos fármacos dentro dos níveis

terapêuticos adequados, além da liberação mais seletiva da droga para um sítio específico (THACHARODI; RAO, 1996).

Na pesquisa de Pavaloiu (2014), filmes compósitos de mono e multicamadas de poli(álcool vinílico)–quitosana–celulose bacteriana (PVA/quitosana/BC) foram preparados para alcançar a liberação controlada de sal de sódio de ibuprofeno (IbuNa) como medicamento modelo. Obteve-se como resultado a decrescente taxa de liberação de IbuNa para todos os filmes à medida que a concentração de CB foi aumentada na composição dos filmes, sendo a diminuição maior para os filmes multicamadas.

Assim, com base nos achados dos artigos apresentados na Tabela 1, torna-se inteligível a importância da utilização de compósitos de celulose bacteriana e quitosana na veiculação de fármacos, bem como na engenharia de tecidos e em outras áreas médicas, além de que novos artigos surjam focados no desenvolvimento de pesquisas para que futuramente sejam iniciado testes em humanos, o qual não ocorreu em nenhum dos experimentos citados.

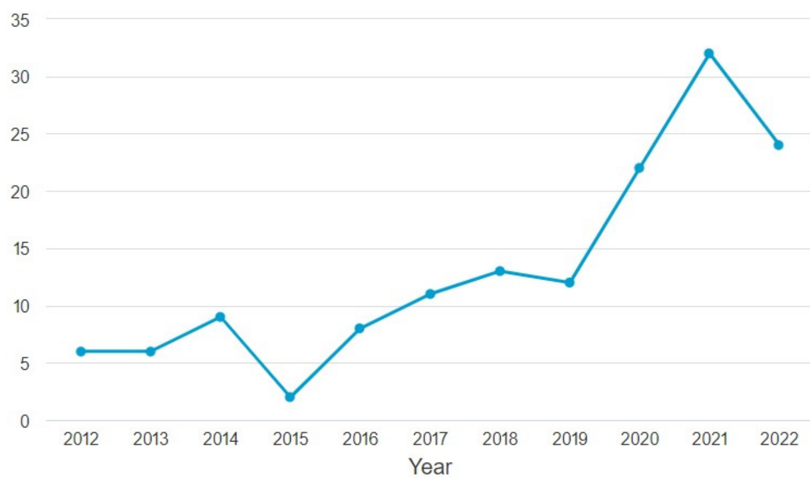


Figura 1 - Número de pesquisas envolvendo compósitos de celulose bacteriana e quitosana nos últimos dez anos.

Fonte: Autoria própria (2022).

A Figura 1 mostra a aplicação da CB-CH como compósitos nos últimos 10 anos (2012-2022), o qual foi derivado de uma pesquisa na base de periódicos *Scopus* utilizando as palavras-chave "*chitosan*" AND "*bacterial cellulose*". A partir dele nota-se uma crescente produção de artigos no decorrer dos anos, com destaque em 2021, com possíveis crescentes no ano de 2022, entretanto, o número de pesquisas durante a última década são relativamentes baixos, considerando as propriedades da celulose bacteriana e quitosana tem a oferecer, como nas sua várias aplicações na biomedicina, tanto quanto nas áreas da saúde apresentados na Tabela 1.

4 I CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste artigo de revisão, foram apresentadas as principais aplicações biomédicas dos biopolímeros de quitosana e celulose bacteriana agregados como biomaterial, explorando o índice de pesquisas desenvolvidas desse compósito durante 2012 e 2022 através da base de periódicos *Scopus, Scielo* e *Google Acadêmico*. Com base nos índices de pesquisa, pode-se observar a crescente produção de materiais a base de CB-CH nos últimos anos. Ademais, as aplicações dos biomateriais se mostraram abrangentes na biomedicina tanto quanto na área da saúde, devido às propriedades benéficas que a celulose bacteriana e quitosana podem oferecer para o organismo. Entretanto é necessário que mais pesquisas sejam feitas, pois apesar de ser uma área próspera, os números são relativamente baixos comparados a quantidade de tipos de materiais existentes na área da saúde e sobretudo devido às vantagens desses materiais nesse âmbito da ciência, assim para que testes em humanos sejam iniciados, beneficiando feridos e doentes que necessitam desses biomateriais para melhor execução de seus tratamentos.

REFERÊNCIAS

AMORIM, Júlia Didier Pedrosa de. **Obtenção de celulose bacteriana aditivada com extrato de própolis para aplicação em cosméticos**. 2020. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco, Recife. Disponível em:.https://repositorio.ufpe.br/handle/123456789/38837. Acesso em: 09 maio. 2022.

AZEVEDO, V. V. C.; CHAVES S. A.; BEZERRA, D. C.; LIA FOOK M. V.; COSTA, A. C. F. **Quitina e Quitosana: aplicações como biomateriais.** Revista Eletrônica de Materiais e Processos, v.2, p.27-34,2007

BORGES, Marco Antonio Costa; SOUSA, Ricardo Barbosa de; CLARO, Amanda Maria; SILVA FILHO, Edson Cavalcanti da; BARUD, Hélida Gomes de Oliveira; BARUD, Hernane da Silva. **BIOPOLÍMEROS PARA REGENERAÇÃO ÓSSEA NA ODONTOLOGIA: uma prospecção tecnológica.** Ciência e Engenharia de Materiais: conceitos, fundamentos e aplicação, [S.L.], p. 128-146, 2021. Editora Científica Digital. http://dx.doi.org/10.37885/210705537.

D'AYALA, G.; MALINCONICO, M.; LAURIENZO, P. M. **Derived polysaccharides for biomedical applications: chemical modification approaches.** Molecules, [S.L.], v. 13, n. 9, p. 2069-2106, 3 set. 2008. MDPI AG. http://dx.doi.org/10.3390/molecules13092069.

FISCHER, Michele Roberta; GARCIA, Michele Cristina Formolo; NOGUEIRA, André Lourenço; et al. **Biossíntese e caracterização de nanocelulose bacteriana para engenharia de tecidos.** Matéria (Rio de Janeiro), v. 22, n. suppl 1, 2018. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-70762017000500428&lng=pt&tlng=pt>. Acesso em: 9 maio 2022.

FRYKBERG, R. G.; BANKS, J. **Challenges in the treatment of chronic wounds. Advances In Wound Care**, [S.L.], v. 4, n. 9, p. 560-582, set. 2015. Mary Ann Liebert Inc. http://dx.doi.org/10.1089/wound.2015.0635.

JAMAL, M.; AHMAD, W.; ANDLEEB, S.; JALIL, F.; IMRAN, M.; NAWAZ, M. A.; HUSSAIN, T.; ALI, M.; RAFIQ, M.; KAMIL, M. A. **Bacterial biofilm and associated infections. Journal Of The Chinese Medical Association**, [S.L.], v. 81, n. 1, p. 7-11, jan. 2018. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). http://dx.doi.org/10.1016/j.jcma.2017.07.012.

KALAN, L. R.; BRENNAN, M. B. **The role of the microbiome in nonhealing diabetic wounds.** Annals Of The New York Academy Of Sciences, [S.L.], v. 1435, n. 1, p. 79-92, 13 jul. 2018. Wiley. http://dx.doi.org/10.1111/nyas.13926.

KHAN, S.; UL-ISLAM, M.; ULLAH, M. W.; ZHU, Y.; NARAYANAN, K. B.; HAN, S. S.; PARK, J. K. **Fabrication strategies and biomedical applications of three-dimensional bacterial cellulose-based scaffolds: a review.** International Journal Of Biological Macromolecules, [S.L.], v. 209, p. 9-30, jun. 2022. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.03.191.

KLEMM, D.; SCHUMANN, D.; UDHARDT, U.; MARSCH, S. **Bacterial synthesized cellulose — artificial blood vessels for microsurgery. Progress In Polymer Science**, [S.L.], v. 26, n. 9, p. 1561-1603, nov. 2001. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/s0079-6700(01)00021-1.

KRISHNARAJ, Chandran; RADHAKRISHNAN, Sivaprakasam; RAMACHANDRAN, Rajan; RAMESH, Thiyagarajan; KIM, Byoung-Suhk; YUN, Soon-Il. **In vitro toxicological assessment and biosensing potential of bioinspired chitosan nanoparticles, selenium nanoparticles, chitosan/selenium nanocomposites, silver nanoparticles and chitosan/silver nanocomposites.** Chemosphere, [S.L.], v. 301, p. 134790, ago. 2022. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.134790.

LIN, Wen-Chun; LIEN, Chun-Chieh; YEH, Hsiu-Jen; YU, Chao-Ming; HSU, Shan-Hui. **Bacterial cellulose and bacterial cellulose–chitosan membranes for wound dressing applications.** Carbohydrate Polymers, [S.L.], v. 94, n. 1, p. 603-611, abr. 2013. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.01.076

PARK, D.; KIM, J. W.; SHIN, K.; KIM, J. W. **Bacterial cellulose nanofibrils-reinforced composite hydrogels for mechanical compression-responsive on-demand drug release.** Carbohydrate Polymers, [S.L.], v. 272, p. 118459, nov. 2021. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118459.

PAVALOIU, Ramona-Daniela; STOICA-GUZUN, Anicuta; STROESCU, Marta; JINGA, Sorin Ion; DOBRE, Tanase. **Composite films of poly(vinyl alcohol)–chitosan–bacterial cellulose for drug controlled release. International Journal Of Biological Macromolecules**, [S.L.], v. 68, p. 117-124, jul. 2014. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.04.040.

PICHETH, G. F.; PIRICH, C. L.; SIERAKOWSKI, M. R.; WOEHL, M. A.; SAKAKIBARA, C. N.; SOUZA, C. F.; MARTIN, A. A.; SILVA, R.; FREITAS, R. A. **Bacterial cellulose in biomedical applications: a review. International Journal Of Biological Macromolecules**, [S.L.], v. 104, p. 97-106, nov. 2017. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.05.171.

PINHO, A. M. M. R.; KENCIS, C. C. S.; MIRANDA, D. R. P.; SOUSA NETO, O. M. **Traumatic perforations of the tympanic membrane: immediate clinical recovery with the use of bacterial cellulose film. Brazilian Journal Of Otorhinolaryngology**, [S.L.], v. 86, n. 6, p. 727-733, nov. 2020. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.bjorl.2019.05.001.

PISKIN, E. **Biodegradable polymers as biomaterials.** Journal Of Biomaterials Science, Polymer Edition, [S.L.], v. 6, n. 9, p. 775-795, jan. 1995. Informa UK Limited. http://dx.doi.org/10.1163/156856295x00175.

RIBEIRO, Charles Lima; ROSSETO, Lucimar Pinheiro; SOUZA, João Maurício Fernandes; PEIXOTO, Josana de Castro. **Compostos bioativos vegetais: uma perspectiva de plantas úteis à saúde e conservação do cerrado.** Tópicos Especiais em Ciências da Saúde: teoria, métodos e práticas 5, [S.L.], p. 90-104, 31 maio 2022. AYA Editora. http://dx.doi.org/10.47573/aya.5379.2.78.8.

SOARES, G. A. **Biomateriais: fórum de biotecnologia biomateriais.** 2005. 84 f. Tese (Doutorado) - Curso de Professora, Programa de Engenharia Metalúrgica e de Materiais, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2005. Disponível em: http://www.biomet.com. Acesso em: 10 set. 2022.

SOUSA, Ricardo Barbosa de; CLARO, Amanda Maria; BARUD, Hernane da Silva; RIBEIRO, Sidney José Lima; SILVA FILHO, Edson Cavalcanti da. **CELULOSE BACTERIANA PARA APLICAÇÕES BIOMÉDICAS: uma prospecção tecnológica. Trabalhos nas Áreas de Fronteira da Química,** [S.L.], p. 63-87, 22 fev. 2021. Atena Editora. http://dx.doi.org/10.22533/at.ed.2432122026.

THACHARODI, D.; RAO, K. P. **Rate-controlling biopolymer membranes as transdermal delivery systems for nifedipine: development and in vitro evaluations. Biomaterials**, [S.L.], v. 17, n. 13, p. 1307-1311, jul. 1996. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/s0142-9612(96)80007-x.

ULERY, B. D.; NAIR, L. S.; LAURENCIN, C. T. **Biomedical applications of biodegradable polymers.** Journal Of Polymer Science Part B: Polymer Physics, [S.L.], v. 49, n. 12, p. 832-864, 5 maio 2011. Wiley. http://dx.doi.org/10.1002/polb.22259.

UL-ISLAM, Mazhar; SUBHAN, Fazli; ISLAM, Salman Ul; KHAN, Shaukat; SHAH, Nasrullah; MANAN, Sehrish; ULLAH, Muhammad Wajid; YANG, Guang. **Development of three-dimensional bacterial cellulose/chitosan scaffolds: analysis of cell-scaffold interaction for potential application in the diagnosis of ovarian cancer.** International Journal Of Biological Macromolecules, [S.L.], v. 137, p. 1050-1059, set. 2019. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.07.050.

XIE, Yajie; QIAO, Kun; YUE, Lina; TANG, Tao; ZHENG, Yudong; ZHU, Shihui; YANG, Huiyi; FANG, Ziyuan. **A self-crosslinking, double-functional group modified bacterial cellulose gel used for antibacterial and healing of infected wound.** Bioactive Materials, [S.L.], v. 17, p. 248-260, nov. 2022. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.bioactmat.2022.01.018.

ZMEJKOSKI, Danica Z.; ZDRAVKOVIć, Nemanja M.; TRIłIć, Dijana D.; BUDIMIR, Milica D.; MARKOVIć, Zoran M.; KOZYROVSKA, Natalia O.; MARKOVIć, Biljana M. Todorović. **Chronic wound dressings – Pathogenic bacteria anti-biofilm treatment with bacterial cellulose-chitosan polymer or bacterial cellulose-chitosan dots composite hydrogels.** International Journal Of Biological Macromolecules, [S.L.], v. 191, p. 315-323, nov. 2021. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.09.11

CAPÍTULO 8

Forcipomyia (Pterobosca) incubans MACFIE (1937) (DIPTERA: CERATOPOGONIDAE) PARASITA DE ASAS DE ODONATA NO BRASIL

Data de aceite: 03/07/2023

Manoel Daltro Nunes Garcia Junior
Doutor em Biodiversidade Tropical, Macapá-Amapá
https://orcid.org/0000-0002-7555-3414

Monique Telcia dos Santos Damasceno
Universidade Federal do Amapá (UNIFAP), Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Tropical (PPGBio), Macapá-Amapá
https://orcid.org/0000-0003-0373-1389

RESUMO: No presente trabalho é apresentado a lista de espécies de Odonata parasitadas por *Forcipomyia (Pterobosca) incubans* Macfie (1937) (Diptera: Ceratopogonidae), com registros para o Brasil. *Forcipomyia* em asas de libélulas já foram registrados em cinco estados brasileiros no Amapá e Pará localizados na região norte, Rio Grande do Sul e Santa Catarina região sul e no estado de Minas Gerais região central do país. No Brasil, tem-se até o momento o registro de 13 espécies parasitadas por Fêmeas de *F.(P.) incubans*, na família Coenagrionidae as espécies *Homeoura chelifera* Selys, 1876 e *Telebasis willinki* Fraser, 1948, em Aeshnidae *Remartinia luteipennis* (Burmeister, 1839) e Libelludae *Erythrodiplax anomala* Brauer (1865), *Erythemis credula* Hagen (1861),*Erythrodiplax juliana* Ris (1911), *Erythemis peruviana* (Rambur, 1842), *Erythemis vesiculosa* (Fabricius, 1775), *Erythrodiplax fusca* (Rambur,1842), *Erythrodiplax umbrata* (Linnaeus, 1758), *Miathyria marcella* (Selys in Sagra,1857), *Orthemis concolor* Ris, 1919 e *Orthemis nodiplaga* Karsch, 1891. O número de espécies de Odonata parasitadas por *F. (P.) incubans* no Brasil provavelmente é muito mais elevado, e a realização de novos estudos devem indicar como a odonatofauna é afetada pelo grupo.

PALAVRAS-CHAVE: América Latina, Diversidade, Parasitismo, Libélulas.

Forcipomyia (Pterobosca) incubans MACFIE (1937) (DIPTERA: CERATOPOGONIDAE) PARASITIZING WINGS OF ODONATA IN BRAZIL

ABSTRACT: The present work presents the list of Odonata species parasitized by *Forcipomyia (Pterobosca) incubans* Macfie (1937) (Diptera: Ceratopogonidae), with records for Brazil. *Forcipomyia* on wings

of dragonflies have already been recorded in five Brazilian states: in Amapá and Pará, located in the northern region, Rio Grande do Sul and Santa Catarina, in the southern region, and in the state of Minas Gerais, in the central region of the country. In Brazil, 13 species parasitized by females of *F.(P.)incubans* in the Coenagrionidae family have been registered so far, the species *Homeoura chelifera* Selys, 1876 and *Telebasis willinki* Fraser, 1948, in Aeshnidae *Remartinia luteipennis* (Burmeister, 1839) and Libelludae *Erythrodiplax anomala* Brauer (1865), *Erythemis credula* Hagen (1861), *Erythrodiplax juliana* Ris (1911), *Erythemis peruviana* (Rambur, 1842), *Erythemis vesiculosa* (Fabricius, 1775), *Erythrodiplax fusca* (Rambur, 1842) *Erythrodiplax umbrata* (Linnaeus, 1758), *Miathyria marcella* (Selys in Sagra, 1857), *Orthemis concolor* Ris, 1919 and *Orthemis nodiplaga* Karsch, 1891. The number of Odonata species parasitized by *F. (P.) incubans* in Brazil is probably much higher, and further studies should indicate how the Odonata fauna is affected by the group.
KEYWORDS: Latin America, Diversity, Parasitism, Dragonflies.

INTRODUÇÃO

A família Ceratopogonidae pertence a ordem Diptera que possui aproximadamente 160 mil espécies descritas (Augusto, 2019). Ceratopogonidae são dípteros Nematocera de tamanho reduzido, que de acordo com o estágio de desenvolvimento apresentam diferentes modos de vida, em seu estágio larval, as espécies podem ser carnívoras, detritívoras, onívoras ou ainda se alimentar do fitoplâncton (McCafferty, 1981). Já as fêmeas adultas do grupo alimentam-se por hematofagia de vertebrados ou sugando a hemolinfa dos invertebrados, essa prática proporciona a obtenção de proteína para a produção e maturação de seus ovos (Borkent & Dominiak, 2020). Entre os Ceratopogonidae o gênero *Forcipomyia* Meigen (1818) garante destaque como um dos grupos mais diversos da família, compreendendo mais de 1.142 espécies descritas em 36 subgêneros atuais e extintos (Borkent & Dominiak, 2020).

Nas regiões tropicais e subtropicais espécies do gênero exercem relevante papel na polinização de plantas com importância comercial, entre elas o cacau (Chapman & Soria, 1983). Dentro de *Forcipomyia* o subgênero *Pterobosca* Macfie (1932) apresenta para Brasil o registro de duas espécies *Forcipomyia (Pterobosca) fusicornis* (Coquillett, 1905) e *Forcipomyia (Pterobosca) incubans* Macfie (1937), mundialmente são registradas 23 espécies para o subgênero (Borkent, 2012).

Representantes da família Ceratopogonidae foram registrados parasitando diversos artrópodes como miriápodes, aracnídeos e insetos (Borkent & Dominiak 2020). Entre os insetos parasitados podemos citar algumas ordens como a Lepidoptera onde ao menos duas espécies do gênero são indicadas como parasitas, *Forcipomyia (Trichohelea) aeronautica* foi associada a família Nymphalidae Santana et al. (2011), *Forcipomyia (Trichohelea) pectinunguis* coletada em Geometridae Kawahara et al. (2006).

Segundo Wildermuth & Martens (2007) diferentes espécies de *Forcipomyia* desenvolveram a habilidade de aderir as asas de Odonata para se alimentar da hemolinfa das veias. *Forcipomyia (Pterobosca) paludis* (Macfie, 1936) com ocorrência na Europa já foi registrada parasitando mais de 80 espécies de Odonata (Wildermuth, 2021). Fêmeas *F. paludis* podem infestar as libélulas logo após a emergência, quando a cutícula do indivíduo ainda está mole (Cordero-Rivera et al., 2019; Wildermuth & Martens 2019), ainda logo após a emergência do adulto podem se fixar em outras partes do corpo como os olhos ou abdômen. Em Odonata adulta *F. paludis* mantem-se quase que exclusivamente na região das asas (Martens et al., 2008). Sendo que outras espécies *Forcipomyia* podem infestar partes do tórax ou da cabeça de odonatas (Quintana et al., 2019).

Em alguns casos a carga parasitária pode ser altíssima, Clastrier et al. (1994) apontou a ocorrência de cerca de 170 fêmeas de *Forcipomyia* presas a asas de uma *Libellula quadrimaculata* Linnaeus, 1758.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas Américas, a espécie de *Forcipomyia* associada as libélulas é *F. (P.) incubans*, de acordo com Guillermo-Ferreira & Vilela (2013) a espécie possui potencial distribuição, pode variar do sul da América do Sul ao México, *F. (P.) incubans* foi descrita por Macfie em 1937 a partir de exemplares coletados em asas de *Argia ulmeca* Calvert, 1902 (Odonata: Coenagrionidae). Na América latina são registradas até o momento 30 ocorrências de Odonata parasitadas por *F. (P.) incubans* (Tabela 1). Sendo que para o Brasil 13 espécies de libélulas (Tabela 1) apresentam registros.

Em praticamente todos os relatos de ocorrência de *F. (P.) incubans* na América latina o ectoparasita está associado as asas de Odonata (Clastrier & Legrand, 1990; Marino & Von Ellenrieder, 1999; Huerta, 2006; Guillermo-Ferreira & Vilela, 2013; Garcia JR et al., 2021), a exceção é apresentada no trabalho de Quintana et al. (2019), onde *F. (P.) incubans* foi encontrado nas asas e no corpo de *Perithemis domitia* Drury, 1773 (Libellulidae)

Para o Brasil o primeiro registro de *F. (P.) incubans* parasitando Odonata foi realizado por Guillermo-Ferreira & Vilela (2013) no estado de Minas Gerais, nesse estudo três espécies da família Libellulidae foram assinaladas *Erythrodiplax juliana* Ris (1911), *Erythrodiplax aff. anomala* Brauer (1865) e *Erythemis credula* Hagen (1861). Garcia JR et al. (2021) indicou a presença de *F. (P.) incubans* para quatro estados brasileiros entre eles: Amapá, Pará, Rio Grande do Sul e Santa Catarina, além de 10 novas espécies a lista de Odonata parasitados por *F. (P.) incubans*, sendo: *Homeoura chelifera* Selys, 1876 e *Telebasis willinki* Fraser, 1948 pertencentes a família Coenagrionidae, *Remartinia luteipennis* (Burmeister, 1839) da família Aeshnidae. Para a família Libellulidae as espécies *Erythemis peruviana* (Rambur, 1842), *Erythemis vesiculosa* (F. 1775), *Erythrodiplax fusca* (Rambur, 1842), *Erythrodiplax umbrata* (L. 1758), *Miathyria marcella* (Selys in Sagra, 1857), *Orthemis concolor* Ris, 1919 e *Orthemis nodiplaga* Karsch, 1891 foram registradas com a presença de *F. (P.) incubans*.

As duas subordens de Odonata ocorrentes no Brasil têm representantes infestados por *F. (P.) incubans,* porém, a maioria das espécies parasitadas pertencem a Anisoptera, no total 11 espécies ou 84% dos registros para o país. A família Libellulidae é de longe a que compreende a maior frequência de espécies com registros (n=10) no Brasil. Entre as espécies da família as representantes do gênero *Erythrodiplax* compreendem 50% das ocorrências de parasitismo por *F. (P.) incubans*. Em estudo realizado por Huerta (2006) a maioria dos casos de parasitismo também ocorreu na família Libellulidae. Na América latina cerca de 87% das espécies de libélulas com a presença de *F. (P.) incubans* pertencem a subordem Anisoptera valor muito próximo ao observado nos registros feitos no Brasil.

Entre os países da América latina, o Brasil é até o momento o que apresenta o maior número de registro de espécies de Odonata (n=13) parasitada por *F. (P.) incubans,* sendo a Guayana Francesa (n=6) a segunda localidade com mais registros. No Brasil, a região Sul e a Norte com oito e cinco espécies de Odonata parasitadas são respectivamente as regiões com o maior número de registros no país.

No novo mundo, principalmente na América do Sul os estudos com *Forcipomyia* são escassos, a falta de informação fica mais evidente quando buscamos dados sobre a interação desses organismos com outras espécies. O número de espécies de Odonata parasitados por *forcipomyia* certamente é muito maior do que o apresentado na literatura atualmente, especialmente no Brasil que comporta a maior diversidade da ordem na região neotropical.

REFERÊNCIAS

AUGUSTO, L. F. C. 2019. Composição da fauna de moscas (Diptera, Brachycera) com ênfase em Stratiomyidae e Asilidae em duas fitofisionomias de Cerrado. Brasília/DF. https://repositorio.ufu.br/bitstream/123456789/20647/6/RiquezaAspectosBiologia.pdf.

BORKENT, A. 2015. World Ceratopogonidae fauna. http://wwx.inhs.illinois.edu/files/ 1114/2384/5200/CeratopogonidaeCatalog.pdf.

BORKENT, A. & DOMINIAK, P. 2020. Catalog of the biting midges of the world (Diptera: Ceratopogonidae). Zootaxa, 4787(1):1–377.

CAVALIERI, F. & CHIOSSONE, I.F. 1965. Notas sobre Ceratopogonidae) (Diptera, Nematocera). IV. "*Pterobosca*" Macfie, nuevo género para Argentina con la redescripción de "*P. incubans*" Macfie. Neotrópica, 11: 64–70.

CHAPMAN, R.K. & SORIA, S.J. 1983. Comparative *Forcipomyia* (Diptera, Ceratopogonidae) pollination of cacao in Central America and Southern Mexico. Revista Theobroma, 13: 129-139.

CLASTRIER, J. & LEGRAND, J. 1990. *Forcipomyia (Pterobosca) incubans* (Macfie) et F. {Trichohelea} machen n. sp. Parasites des ailes de libellules en Guyane Française (Diptera, Ceratopogonidae; Odonata). Revista France Entomologique, 12: 167- 170.

CLASTRIER, J.; GRAND, D. & LEGRAND, J. 1994. Observations exception-nelles en France de *Forcipomyia (Pterobosca) paludis* (Macfie), parasite de ailes de Libellules (Diptera, Ceratopogonidae et Odonata). Bull. Soc. Ent. Fr. 99:127-130.

CORDERO-RIVERA, A.; BARREIRO, A.R. & OTERO, M.C. 2019. *Forcipomyia paludis* (Diptera: Ceratopogonidae) in the Iberian Peninsula, with notes on its behavior parasitizing Odonates. Bol SEA, 64:243–250.

GARCIA JR, M.D.N.; DAMASCENO, M.T.S.; MARTINS, M.J.L.; COSTA, T.S.; FERREIRA, R.M.A. & SOUTO, R.N.P. 2021. New records of *Forcipomyia (Pterobosca) incubans* Macfie (1937) (Diptera: Ceratopogonidae) parasitizing wings of Odonata in Brazil. Brazilian Journal of Development. 7(3): 29996-30001.

GUILLERMO-FERREIRA, R. & VILELA, D.S. 2013. New records of *Forcipomyia (Pterobosca) incubans* (Diptera: Ceratopogonidae) parasitizing wings of Odonata in Brazil. Biota Neotropica, 13(1). http://dx.doi.org/10.1590/S1676- 06032013000100037

HUERTA, H. 2006. Nuevo registro de *Forcipomyia (Pterobosca) incubans* (Macfie) (Diptera: Ceratopogonidae) como parásito de Odonata. Acta Zoologica Mexicana, 22: 157-158.

JOHANNSEN, O.A. 1951. Notes on North American species of *Pterobosca*. Florida Entomologist, 34: 116-117. http://dx.doi.org/10.2307/3492023

KAWAHARA, A.; WINKLER, I. & HSU, W. 2006. New host records of the ectoparasitic biting midge *Forcipomyia (Trichohelea) pectinunguis* (Diptera: Ceratopogonidae) on adult geometrid moths (Lepidoptera: Geometridae). Journal of the Kansas Entomological Society, 79(3): 297-300.

MACFIE, J.W.S. 1937. Notes on Ceratopogonidae (Diptera). Proceedings of the royal entomological society of London, 6: 111-118.

MCCAFFERTY, W.P. 1981. Aquatic Entomology: The fisherman's and ecologist's illustrated guide to insects and their relatives. Science Books International. Boston.

MARINO, P.I. & VON-ELLENRIEDER, N. 1999. New records of *Forcipomyia (Pterobosca) incubans* (Macfie) (Diptera: Ceratopogonidae) on libellulids (Anisoptera). Notulae odonatologicae, 5: 38-39.

MARTENS, A.; EHMANN, H.; PEITZNER, G.; PEITZNER, P. & WILDERMUTH, H. 2008. European Odonata as hosts of *Forcipomyia paludis* (Diptera: Ceratopogonidae). International Journal of Odonatology, 11: 59-70.

QUINTANA, A.T.; CAMBAS, Y.T.; TORRES, A.R.; FERREIRA, S. & RIVERA, A.C. 2019. The first record of parasitism by *forcipomyia* (Diptera: Ceratopogonidae) in cuban odonates. Novitates Caribaea, 14: 105-110.

SANTANA, H.R.G.; BORKENT, A.; JACQUES, C. J. & JAUFFRET, P. 2011. *Forcipomyia (Trichohelea) aeronautica* Macfie (Diptera: Ceratopogonidae): further records from Brazil and new lepidopterous hosts. Boletín de la Sociedad Entomológica Aragonesa (S.E.A.), 49: 349-350.

WILDERMUTH, H. & MARTENS, A. 2007. The feeding action of *Forcipomyia paludis* (Ceratopogonidae, Diptera), a parasite of Odonata imagines. International journal odonatology, 10: 249-255.

WILDERMUTH, H. 2021. Die Libellengnitze Forcipomyia paludis – eine kurze Entdeckungsgeschichte. Libellennachrichten, 46:6–11.

WILDERMUTH, H. & MARTENS, A, 2019. Die Libellen Europas. Quelle & Meyer, Wiebelsheim.

WIRTH, W.W. 1956. New species nad records of biting midges ectoparasitic on insects (Diptera, Heleidae). Annals of the Entomological Society of Americ, 49: 356- 364.

Subordem/ Família	Espécies	Estado brasileiro de ocorrência	País de Registrado	Referência
Zygoptera				
Calopterygidae				
	Hetaerina occisa Hagen in Selys, 1853		México	Wirth, 1956
Coenagrionidae				
	Argia ulmeca Calvert, 1902		Belice	
	Homeoura chelifera (Selys, 1876)	RS	Brasil	Garcia JR et al., 2021
	Telebasis willinki Fraser, 1948	RS	Brasil	Garcia JR et al., 2021
Anisoptera				
Aeshnidae				
	Coryphaeschna viriditas Calvert, 1952		Guayana Francesa	Clastrier & Legrand, 1990
	Remartinia luteipennis (Burmeister, 1839)	RS	Brasil	Garcia JR et al., 2021
Gomphidae				
	Gomphidae (indeterminado)		Argentina	Cavalieri & Chiossone, 1965
	Phyllogomphoides suasus Selys, 1859		México	Wirth, 1956
Libellulidae				
	Crocothemis servilia (Drury, 1773)		Cuba	Quintana et al., 2019
	Dythemis velox Hagen, 1861		México	Wirth, 1956
	Erythrodiplax sp.		Argentina	Cavalieri & Chiossone, 1965
	Erythrodiplax juliana Ris (1911)	MG	Brasil	Guillermo-Ferreira & Vilela, 2013
	Erythrodiplax anomala Brauer (1865)	MG	Brasil	Guillermo-Ferreira & Vilela, 2013
	Erythemis crédula Hagen (1861)	MG	Brasil	Guillermo-Ferreira & Vilela, 2013

Erythrodiplax fusca (Rambur, 1842)	RS	Brasil	Garcia JR et al., 2021
Erythrodiplax umbrata (Linnaeus, 1758)	AP, PA	Brasil, Colombia, Cuba	Wirth, 1956; Quintana et al., 2019; Garcia JR et al., 2021
Erythrodiplax melanorubra Borror, 1942		Argentina	Marino & Von Ellenrieder, 1999
Erythemis simplicicollis (Say 1840)		Cuba	Quintana et al., 2019
Erythemis peruviana (Rambur 1842)	AP, RS	Brasil	Garcia JR et al., 2021
Erythemis vesiculosa (Fabricius, 1775)	AP, RS, SC	Brasil, Puerto Rico	Johannsen, 1951; Garcia JR et al., 2021
Libellula herculea Karsch, 1889		Guayana Francesa	Clastrier & Legrand, 1990
Miathyria marcella (Selys in Sagra, 1857)	AP, RS, SC	Brasil, Argentina	Marino & Von Ellenrieder, 1999; Garcia JR et al., 2021
Micrathyria sp		Argentina	Cavalieri & Chiossone, 1965
Misagria parana Kirby, 1889		Guayana Francesa	Clastrier & Legrand, 1990
Orthemis concolor Ris, 1919	AP, PA	Brasil	Garcia JR et al., 2021
Orthemis nodiplaga Karsch, 1891	RS	Brasil	Garcia JR et al., 2021
Orthemis schmidti Buchholz, 1950		Guayana Francesa	Clastrier & Legrand, 1990
Orthemis ambirufa Calvert, 1909		Guayana Francesa	Clastrier & Legrand, 1990
Perithemis domitia Drury, 1773		Cuba	Quintana et al., 2019
Uracis imbuta (Burmeister, 1839)		Guayana Francesa	Clastrier & Legrand, 1990

Tabela 1. Lista de espécies de Odonata com registro de parasitismo por *F. (P.) incubans* nas Américas. Abreviações: AP-Amapá, MG-Minas Gerais, PA-Pará, RS-Rio Grande do Sul e SC- Santa Catarina.

CAPÍTULO 9

A IMPORTÂNCIA DAS FEIRAS DE CIÊNCIAS: PERCEPÇÕES DOS PROFESSORES DO ENSINO MÉDIO NO MUNICÍPIO DE CAMPOS SALES – CE

Data de submissão: 05/06/2023 *Data de aceite: 03/07/2023*

Maria Mariana Santos de Sousa
Universidade Regional do Cariri, Departamento de Ciências Biológicas, Campos Sales, CE
http://lattes.cnpq.br/7555864338860378

Marcos Aurélio Figueiredo dos Santos
Universidade Regional do Cariri, Departamento de Ciências Biológicas, Campos Sales – CE
http://lattes.cnpq.br/8643818710205791

Georgia Maria de Alencar Maia
Universidade Regional do Cariri, Departamento de Ciências Biológicas, Crato – CE
http://lattes.cnpq.br/6998170734884455

Dieferson Leandro de Souza
Universidade Regional do Cariri, Departamento de Ciências Biológicas, Crato – CE
http://lattes.cnpq.br/1219143074518873

Mariana Ferreira da Cruz
Universidade Regional do Cariri, Departamento de Ciências Biológicas, Crato – CE
http://lattes.cnpq.br/0227677863998529

Ginna Gonçalves Pereira
Universidade Regional do Cariri, Departamento de Ciências Biológicas, Crato – CE
http://lattes.cnpq.br/4863368414371383

Luana Vinuto Silva
Universidade Estadual do Ceará, Departamento de Ciências Biológica Iguatu, CE
http://lattes.cnpq.br/5747413933611370

Márcia Taíza Pereira da Cruz
Universidade Regional do Cariri, Departamento de Ciências Biológicas, Missão Velha, CE
http://lattes.cnpq.br/4307002310394419

Raquel Furtado dos Santos Moura
Universidade Regional do Cariri, Departamento de Ciências Biológicas, Missão Velha, CE
http://lattes.cnpq.br/4338464292850824

Karolyna Pereira Martins
Universidade Regional do Cariri, Departamento de Ciências Biológicas, Missão Velha, CE
http://lattes.cnpq.br/8269126220732228

José Weverton Almeida-Bezerra
Universidade Regional do Cariri, Departamento de Ciências Biológicas, Crato, CE
http://lattes.cnpq.br/5570296179611652

Rafael Pereira da Cruz
Universidade Regional do Cariri, Departamento de Ciências Biológicas, Campos Sales, CE
http://lattes.cnpq.br/3675589918865790

RESUMO: As Feiras de Ciências, são vistas como atividades, realizadas fora da sala de aula normalmente no pátio das escolas. São pesquisas e assuntos investigados por alunos do ensino fundamental e médio, onde os mesmos buscam conhecimento de um determinado tema, e procuram uma possível solução, possibilitando a esses alunos desenvolverem competências e habilidades científicas. Nesse sentido, o objetivo geral da pesquisa foi refletir sobre a importância das feiras de ciências no processo de ensino aprendizagem dos alunos e no ensino científico em uma escola de Ensino Médio no município de Campos Sales-CE. O método utilizado foram questionários eletrônicos por meio do Google forms, onde nele continham perguntas objetivas e subjetivas, sendo realizada com 5 professores de ciências da natureza, a pesquisa apresenta natureza qualitativa. A pesquisa mostrou resultados satisfatórios ficando evidente que as feiras de ciências são realizadas na escola da referida pesquisa e que a mesma é considerada como positiva no processo de ensino-aprendizagem tornando os educandos protagonistas do seu aprendizado. Dessa forma, podemos inferir que as feiras de ciências são estratégias imprescindíveis no ensino, pois proporciona ao aluno a construção do conhecimento, desenvolvimento e gosto pela pesquisa. Sendo assim, é fundamental que as instituições escolares de forma geral, esteja sempre divulgando a ciência por meio das feiras e mostras científicas.
PALAVRAS-CHAVE: Divulgação científica, Docentes, Ensino-aprendizagem.

THE IMPORTANCE OF SCIENCE FAIRS: PERCEPTIONS OF HIGH SCHOOL TEACHERS IN THE MUNICIPALITY OF CAMPOS SALES – CE

ABSTRACT: Science Fairs are seen as activities, carried out outside the classroom, usually in the school yard. They are researches and subjects investigated by elementary and high school students, where they seek knowledge of a certain topic, and look for a possible solution, enabling these students to develop scientific skills and abilities. In this sense, the general objective of the research was to reflect on the importance of science fairs in the teaching-learning process of students and in scientific teaching in a high school in the municipality of Campos Sales-CE. The method used was electronic questionnaires through Google forms, which contained objective and subjective questions, being carried out with 5 teachers of natural sciences, the research has a qualitative nature. The research showed satisfactory results, making it evident that the science fairs are held in the school of the referred research and that it is considered as positive in the teaching-learning process, making the students protagonists of their learning. Thus, we can infer that science fairs are essential teaching strategies, as they provide students with knowledge construction, development and a taste for

research. Therefore, it is essential that school institutions in general are always disseminating science through fairs and scientific exhibitions.
KEYWORDS: Scientific dissemination, Teachers, Teaching-learning.

1 I INTRODUÇÃO

A educação tem como objetivo oferecer conhecimento do mundo modernizado para os discentes, e a mesma tem como função formar educandos que entendam e aprendam os conteúdos que norteiam o mundo científico e tecnológico, pois estes devem estar aptos a tomar decisões dentro de uma sociedade que tem passado por atualizações, ao longo do tempo (SANTOS et al., 2019).

Dessa forma, se faz necessário que seja introduzido nas escolas projetos que visem o ensino científico, que despertem no aluno a curiosidade, o gosto pela pesquisa e o fazer científico, e isso será possível se estas escolas apresentarem na sua grade curricular as feiras de ciências. Pois, dessa maneira estará colocando o aluno frente ao conhecimento científico, onde este possa ser protagonista na sua formação (COSTA; ZOMPERO, 2017).

Pois, segundo Bertoldo e Cunha (2016), com as feiras de ciências na escola a mesma estará de uma certa forma, difundindo essa área tão importante para os educandos como também para a sociedade. Aumentando o interesse e curiosidade desses aprendizes pela ciência e interesse também pela pesquisa. Dessa forma, a escola ao disseminar ciências por meio de feiras, também estará despertando a curiosidade e visão dos alunos, não só em relação à ciência mas também à Tecnologia.

Logo, as Exposições Científicas são vistas como atividades realizadas fora da sala de aula normalmente nos pátios das escolas. São pesquisas e assuntos investigados por alunos do ensino fundamental e médio, onde os mesmos buscam conhecimento de um determinado tema, e procuram uma possível solução, possibilitando a esses alunos desenvolverem competências e habilidades científicas (CASTRO- JUNIOR 2019).

As Feiras de Ciências, são consideradas como boas estratégias metodológicas que, facilitam o processo educacional, trazendo oportunidades, fazendo com que os alunos se comuniquem melhor, de uma forma mais interessante e divertida, fugindo da velha tradicionalidade (ADAMS, 2020).

Ainda de acordo com Adams (2020) essas feiras podem trazer para esses alunos uma vasta quantidade de conhecimento e posicionamento, tornando estes capazes de produzir e realizar pesquisas, buscar conhecimentos e assuntos diversificados, levando-os a serem mais curiosos e trabalharem em equipe, pois, assuntos científicos além de despertar o intelecto do aluno, vai torna-los mais comunicativos e que estes se interessem pela pesquisa. Além do que essas feiras fazem com que os educandos, realizem atividades diferentes daquelas realizadas em sala de aula, apenas por meio do livro didático e utilizando-se de aulas práticas e lúdicas.

Em tais feiras são escolhidas algumas temáticas que passam por todo um planejamento, onde se engaja o discente, instigando o mesmo, a pesquisar dentro das escolas, problemas relacionados à Ciência, Sociedade, Ambiente e Tecnologia (CTSA), que seja possível procurar uma solução e encontrar um resultado, além de que, este educando se tornará um pesquisador, em busca de conhecimentos e com a orientação de um professor (SANTOS et al., 2020).

De acordo com Hilário, et al (2020) os Parâmetros Curriculares Nacionais (PCN´S, 1997), nos primeiros anos escolares já se deve ser introduzido o ensino científico, ou seja, a criança já deve ter contato com temas voltados à pesquisa científica, permitindo a essa, convívio com conteúdos científicos e saber se expressar. Desenvolvendo nessa criança os primeiros contatos com a ciência.

Nas considerações realizadas por Hilario et al (2020), é importante que a criança compreenda o ensino de ciências para melhor entender como funciona tudo a sua volta. Visto que, a ciência é essencial para formar cidadãos críticos e reflexivos e alfabetizados cientificamente e que estes fiquem a par das questões sociais e sejam capazes de compreender melhor o ensino científico e as ferramentas tecnológicas.

A partir disso, é importante verificar se os alunos de ensino médio compreendem e dominam o conhecimento científico, e se os mesmos, enquanto aprendizes, buscam este conhecimento e participam frequentemente das feiras científicas ofertadas pela escola. Além disso, há uma contribuição não só para os educandos da educação básica, mas também, que enquanto futuros acadêmicos na área de ciências da natureza cheguem na universidade alfabetizados cientificamente, e sabendo a importância do fazer ciência, para quando futuros professores, proponham ações e melhorias, com um olhar crítico e reflexivo dentro das reuniões escolares para que o aluno seja também um bom profissional.

A instituição escolar poderá contribuir estudando mais ainda esse assunto, disseminando e orientando os seus discentes, para que estes quando futuros profissionais a atuar no magistério, conduzam os seus alunos ao fazer científico, evitando que estes cheguem a universidade sem saber como fazer um projeto científico. É importante que os educandos tenham contato direto com a pesquisa, pois esta vai auxiliar no seu desenvolvimento, reflexão, na capacidade deste educando de argumentar, fazendo com que este se aproxime mais e mais da linguagem científica (DA COSTA; ZOMPERO, 2017).

Dessa forma, o estudo tem como objetivo geral, refletir sobre a importância das feiras de ciências no processo de ensino aprendizagem dos alunos e no ensino científico em uma escola de Ensino Médio no município de Campos Sales-CE. Para conduzir essa análise partiu-se da seguinte indagação: Qual a importância das feiras de ciências no aprendizado dos educandos?

2 | MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Delineamento do Estudo

A pesquisa foi de campo, apresentando natureza descritiva e aconteceu por meio de abordagem qualitativa estudada a partir dos objetivos definidos. Gil (2008) pontua que estudo de campo é o momento em que o pesquisador vai ter um contato direto com sua pesquisa. A pesquisa apresenta natureza descritiva pois, a mesma está descrevendo algum acontecimento dentro de uma população, e a mesma tem como uma de suas características principais a coleta dos dados que serão necessários para desenvolver a pesquisa (GIL, 2008). A pesquisa qualitativa não se preocupa com representatividade numérica, mas sim, com o aprofundamento da compreensão de um grupo social, ou seja, de uma organização. "A mesma vai pesquisar de forma subjetiva como o ser humano age, ou seja, seu comportamento" (GERHARDT e SILVEIRA, 2009, P.31).

2.2 Local e Período de Coleta de Dados

O estudo foi desenvolvido em uma escola pública de ensino médio, localizada na zona urbana do município de Campos Sales. Na escola escolhida para o desenvolvimento da pesquisa do município de Campos Sales – CE. O município se estende por 1.082,582 km² e conta com 27.513 habitantes no último censo (IBGE, 2021). A densidade demográfica é de 24,48 habitantes por km2. Os dados foram coletados no mês de Dezembro de 2022.

2.3 Universo da Pesquisa

A pesquisa foi realizada com professores da área de ciências da natureza, tendo em vista saber da sua percepção, quanto à importância que tem as feiras de ciências para os alunos do Ensino Médio, esse estudo foi desenvolvido na escola de Ensino Médio de Campos Sales.

2.4 Instrumentos e Procedimentos de Coleta de Dados

A pesquisa foi realizada por meio de questionário eletrônico com perguntas objetivas e subjetivas, para investigar de que forma acontece as feiras de ciências nas escolas. Questionários são instrumentos utilizados no momento de coletar os dados e o mesmo tem como função apresentar um banco de questões que serão respondidas pela pessoa que está sendo pesquisada (GIL, 2007). Estes questionários foram aplicados por meio do Google Forms, disponibilizados via WhatsApp, em seguida foram recolhidos para análise das respostas e elaboração dos gráficos.

2.5 Aspectos Éticos e Legais da Pesquisa

O presente estudo, atendeu às exigências éticas e científicas fundamentadas nas Resoluções Nº 466/12 e Nº 510/2016 do Conselho Nacional de Saúde (BRASIL, 2012;

BRASIL, 2016). Pois, o mesmo deve prezar pelo o bem-estar dos participantes, tendo total anonimato da identidade dos mesmos. Foi apresentada carta de anuência a diretora da escola e TCLE para os participantes, a participação dos professores ocorreu de forma voluntária e estes foram informados sobre os objetivos, riscos e benefícios da pesquisa, para preservar a identidade dos participantes estes foram identificados no texto como Professor 1,2,3,4 e 5.

3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Coleta de dados foi realizada por meio da plataforma Google Forms, com os professores de Ciências da natureza. O intuito da pesquisa era que todos os professores da área de ciências da natureza respondessem o presente questionário, porém apenas cinco aceitaram participar da pesquisa.

Na primeira pergunta, foi questionado qual a formação acadêmica de cada docente e vimos que 2 são professores de Ciências Biológicas, 1 de Física, 1 de Química e 1 de outra disciplina não identificada. A escola apresenta mais professores que a quantidade citada acima, porém, como a pesquisa foi realizada justo no período em que a instituição estava realizando avaliação de final de semestre e todos estavam sobrecarregados de conteúdos e planejamentos.

Na segunda pergunta foi indagado aos professores sobre seu tempo de trabalho como docente, dois professores disseram ter 8 anos, um disse ter 14 anos, outro respondeu que ministrava aula desde 2018 o que corresponde a aproximadamente 5 anos de magistério.

Na terceira pergunta quando perguntado aos professores se a escola que os mesmos trabalham, costumava realizar eventos de divulgação científica e caso a resposta fosse sim, pedia para que eles citassem algum evento. E abaixo temos as respostas desses professores:

Professor 1	**Sim. Mostras Científicas**
Professor 2	**Sim. Mostras cientificas e eventos culturais**
Professor 3	**Feira de Ciências**
Professor 4	**Sim**
Professor 5	**Sim, Feiras de Ciências**

Table 1 - Participants' perceptions of sustainability.

Fonte: Autora (2023).

Todos os professores responderam feiras de ciências e mostras científicas, ficando evidente que a instituição preza muito pela divulgação científica nas escolas por meio desses eventos. Por isso, Mancuso (2006) traz no seu livro que, as feiras de ciências, são eventos que acontecem nas instituições escolares, onde há de certa forma uma troca de informação e comunicação entre educandos e sociedade, sobre os conhecimento e

experiências adquiridas pelos alunos ao realizar a pesquisa mostrando a importância desses trabalhos. Além disso, ao participar de feirinhas de ciências, o educando, apresenta uma maior reflexão, tanto em relação aos exercícios realizados, como, partilhar dessa experiência com colegas que ainda não presenciaram como funciona tal atividade (BERTOLDO, CUNHA 2016).

Além disso, é um momento de socialização, entre professor, aluno e comunidade, onde os alunos desenvolvem o seu psicológico na construção de conhecimentos e preparação deste educando, pois é nesse momento que vai existir um vínculo maior entre docente e discente, onde vão dividir seus conhecimentos entre si (SILVEIRA; SILVEIRA e FREIBERG 2020).

A quarta pergunta foi sobre a periodicidade dos eventos na escola, quantas vezes estes ocorriam, de todas as alternativas os professores responderam que estes eventos ocorriam anualmente, ou seja, uma vez a cada ano.

Nota-se que na escola ocorre sim eventos científicos, pois é uma forma de se levar a ciência para os educandos e sociedade como um todo, e que esta disciplina é crucial na vida de todos. Pois de acordo com Da Silva et al, (2017), a ciência está cercada por questionamentos e estes são frutos do conhecimento científico, pois para a ciência o perguntar abre caminhos para o pesquisar e para que a ciência seja disseminada, ela precisa ser estudada e ensinada para os educandos, sendo a mesma de grande importância para a construção do conhecimento científico e fundamental para que os discentes sejam educados cientificamente.

Na quinta pergunta foi questionado aos docentes qual a melhor contribuição das Feiras de Ciências no ambiente escolar, e 60% deles responderam ser valorizar a interdisciplinaridade, o envolvimento e a interação entre alunos, professores, comunidade escolar e o público geral; outros 20% disseram ser estimular a investigação científica, interesse, criticidade e capacidade de inovação; e mais outros 20% disseram ser possibilitar a seleção dos melhores trabalhos para premiações e participação em eventos nacionais (Tabela 3).

Perguntas	**Respostas (%)**
Estimular a investigação científica, interesse, criticidade e capacidade de inovação;	20%
Promover práticas de pesquisa e divulgação dos avanços científicos e tecnológicos para a comunidade escolar e a população local;	0
Valorizar a interdisciplinaridade, o envolvimento e a interação entre alunos, professores, comunidade escolar e o público geral;	60%
Possibilitar a seleção dos melhores trabalhos para premiações e participação em eventos nacionais.	20%
Outros	0

Tabela 3: Contribuições das Feiras de Ciências no ambiente escolar.

Fonte: Autora (2023).

Percebe-se que os docentes apresentam ponto de vistas bem diferentes um dos outros, todavia, os docentes deram boas respostas, porém pelas respostas dada por maioria dos docentes, percebe-se que eles consideram mais importante a conexão que existe entre educando, educador e comunidade e a valorização da interdisciplinaridade. E como diz Adams, Alves e Nunes (2020), esses eventos, além de aproximar aluno e professor, afastando aquele tradicionalismo e tornando o mesmo mediador do conhecimento, estas mostras ainda vão estreitar laços entre alunos e comunidade escolar. Na sexta pergunta, foi perguntado aos professores se eles consideram as feiras de ciências como meio de divulgação científica, abaixo temos as respostas dos mesmos:

> "*Claro que sim, por elas vemos, o conhecimento em sala de aula ser bem aplicado e fluir melhor"* (Professor 1)
>
> "*Sim*" (Professor 2)
>
> "*Sim, por que a depender do trabalho coordenado pelo professor, possa estimular a pesquisa de qualquer pessoa que se interesse pelo assunto*" (Professor 3)
>
> "*Sim*" (Professor 4)
>
> "*Sim, todavia muitos professores não conhecem os processos metodológicos, que envolvem o fomento de projetos*" (Professor 5)

Fica evidente que os professores enxergam as feiras de ciências como um meio de divulgação científica eficaz para o processo de ensino aprendizagem dentro das ciências, todavia, uma das respostas relata que os professores não conhecem os processos metodológicos utilizados para realizar tais projetos. É perceptível que muitos professores ainda não são bem capacitados para se transmitir a ciência, o que fica claro que os mesmos precisam estar sempre procurando se renovar e buscando uma formação continuada.

Dessa forma, Gallon (2019), ressalta que, a formação do professor é um processo contínuo, ou seja, que o professor deve estar sempre buscando novos conhecimentos de maneira que o mesmo se torne apto a transmitir o conhecimento para seu educando, para que o mesmo possa viver em uma sociedade que sempre está evoluindo.

O autor ainda ressalta que, o professor apresenta a sua volta diversas formas de práticas pedagógicas que podem melhorar bastante suas aulas, no entanto, parte desses profissionais não fazem o uso dessas práticas, sendo necessário ser realizado cursos e oficinas que os capacitem e os instiguem a fazerem o uso dessas práticas metodológicas, utilizado recursos que os tornem melhor como profissional e enriqueça suas aulas.

Na sétima pergunta os professores foram questionados se os alunos têm papel ativo nas Feiras de Ciências e como ocorre essa participação, abaixo temos as respostas dos docentes.

> "*Sim, eles são os protagonistas das ações das pesquisas etc*..." (Professor 1)
>
> "*Amplia a participação por ser mais dinâmico, mas mesmo assim, muitos alunos tem baixa participação*" (Professor 2)

> "*Pesquisador*" (Professor 3)
>
> "*Eles são protagonistas. Buscam temas, interrogam e tentam alcançar objetivos, desenvolvem competências e habilidades antes inatas*" (Professor 4)
>
> "*Sim, Eles são os principais protagonistas nas feiras ,por fazerem pesquisas, tentando assim alcançar seus objetivos.*" (Professor 5)

É perceptível que, essas feiras tornam os alunos mais participativos e protagonistas da sua aprendizagem, além de que esses eventos levam a estes alunos a buscarem pela pesquisa científica, porém os docentes relatam que ainda há baixa participação de alguns alunos, e muitas vezes isso acontece, por conta que o docente não utiliza meios que desperte a atenção destes educandos, como é o caso de recursos metodológicos que facilite o aprendizado e instigue esse aluno a pesquisar.

Portanto, o docente também deve passar por uma avaliação, se o mesmo está ofertando meios que facilite a compreensão dos seus educandos para determinados assuntos. Entende-se assim que deve ser ofertado não só modelos didáticos para os educandos, mas também, formação continuada para os professores, cursos que ofereçam aos mesmos, formas que facilitem o processo de ensino-aprendizagem (PEREIRA, 2019).

Na oitava pergunta os docentes foram questionados sobre qual a importância das Feiras de Ciências no processo de ensino-aprendizagem, e a resposta seria dada de acordo com a opinião dos mesmos, abaixo temos as respostas dos professores.

> "*As feiras de ciências possibilitam aos alunos a oportunidade de vivenciarem a pesquisa de uma forma prática, já que por meio da realização dos projetos científicos os alunos pesquisam, formulam hipóteses, experimentam, fazem observações e interpretam os resultados obtidos.*" (Professor 1)
>
> "*Importante, pois o aluno fica imerso em um processo em que ele constrói a aprendizagem*" (Professor 2)
>
> "*Protagonismo*" (Professor 3)
>
> "*É importante para enriquecer o conhecimento e a aprendizagem do aluno de uma forma mais prática.*" (Professor 4)
>
> "*Porque possibilita a pesquisa, assimilação e aprofundamento de conteúdo dentro e/ou fora da grade curricular normal.*" (Professor 5)

Pode-se ver por meio das respostas dos docentes, que mais uma vez as feiras de ciências são formas de fazer com que o aluno se interesse pela pesquisa científica, que estas tornam os educandos rico em conhecimento, além de que os mesmos se tornam ativo no processo de ensino aprendizagem. Desse modo, as feiras e mostras científicas estimulam aos educandos a participarem do processo de ensino aprendizagem, tornando o mesmo um sujeito ativo dentro das ciências da natureza (RUAS; HECKLER e ARAUJO, 2021).

Na nona questão os docentes foram questionados sobre as principais dificuldades encontrada nas feiras de ciências. 60% disseram ser pela falta de tempo para planejamento

no calendário letivo, 20% disseram ser falta de materiais, recursos e apoio financeiro e 20% responderam ser outras dificuldades (Tabela 4).

Perguntas	Respostas (%)
falta de tempo para planejamento no calendário letivo	60%
Falta de materiais, recursos e apoio financeiro	20%
Falta de participação dos alunos e da comunidade local	0
Falta de colaboração e articulação das entidades públicas educacionais	0
Outros	20%

Tabela 4: Principais dificuldades encontradas na execução das Feiras de Ciência

É importante destacar que para que um projeto seja efetivado com sucesso, este vai precisar de um tempo razoável para ser planejado, pois caso não tenha essa disponibilidade, não será possível realizar uma boa pesquisa. Desse modo, Lima (2019), profere dizendo que um bom projeto, bem lapidado, precisa de tempo, no entanto, muitas vezes os projetos são realizados em um curto prazo, o que faz com que estes não fiquem excelentes, além de que estará prejudicando o docente que não consegue uma preparação adequada.

Além disso, tem-se também os fatores que dificultam a excelência de um bom projeto, como é o caso da falta de recursos financeiros. Pois, a falta de apoio e de recursos que poderiam auxiliar professor para que se realizasse um bom projeto, limitam muito fazer algo melhor, para uma pesquisa mais profunda e rica em conteúdos, ou seja, a escola não possui instrumentos suficientes, que possa auxiliar esse docente (BOROCHOVICIUS; TASSONI, 2021).

Na décima questão os professores foram questionados se eles enquanto docentes, achavam que as feiras de ciências no ambiente escolar é uma experiência positiva, e todos responderam que sim, que consideram esses projetos como positivos.

Constatou-se por meio das respostas dos professores, que as feiras contribuem para o desenvolvimento, interdisciplinaridade, na pesquisa e na investigação científica. Sendo assim, Adams; Alves e Nunes, (2020), afirmam que as feiras científicas possibilitam ao aluno participar de pesquisas, onde estes irão se envolver e buscar pelas respostas que tanto desejam, os tornando pertinentes na investigação científica, saindo daquele velho hábito, do aluno que sempre recebe a informação e se tornando um aluno ativo no processo de ensino aprendizagem.

4 | CONCLUSIONS

Foi identificado por meio dessa pesquisa, que os docentes de Ciências da Natureza da escola de Ensino Médio de Campos Sales, percebem as feiras de ciências, como importantes no processo de ensino aprendizagem dos alunos e que esses projetos

contribuem para o processo educacional do educando. Além de levar estes a obter mais sucesso na sua vida estudantil ou em qualquer lugar fora dos muros da escola dentro da sociedade.

Através desse projeto foi possível identificar a importância do ensino de ciências nas escolas, também a abordagem de aprendizagem por meio de projetos científicos e foi possível ver a capacidade que um projeto científico tem de tornar os alunos participativos e atuantes na pesquisa científica. Portanto, as feiras de ciências são vistas como ótimos recursos e ferramentas dentro do ensino de ciências, e estas vem acompanhadas de um conjunto de contribuições, desde estimular os alunos a investigação científica tornando estes mais crítico e reflexivo. Essas feiras ainda propagam a interdisciplinaridade, além da interação entre professor, aluno e comunidade escolar.

É notável, que a referida escola escolhida para a pesquisa, utiliza muito das feiras e mostras científicas como meio de divulgação científica, e que os educandos são vistos como protagonistas do seu aprendizado, fazendo com que os discentes assimilem melhor o conteúdo. Porém, foi visto que a falta de tempo e material nas escolas impossibilita bastante a pesquisa, impedindo que estes eventos sejam bem elaborados, planejados e tenha um resultado positivo.

Portanto, é necessário que as escolas e professores, se organizem melhor para um bom projeto, que as escolas ofereçam materiais que auxilie o docente a desenvolver uma pesquisa que investigue sobre o assunto que será desenvolvido e apresentado para a comunidade escolar, contribuindo dessa forma para a formação cidadã do aluno.

Conclui-se, que dessa forma, as feiras de ciências são estratégias imprescindíveis no ensino, pois proporciona ao aluno a construção do conhecimento, desenvolvimento e gosto pela pesquisa. Sendo assim, é fundamental que as instituições escolares de forma geral, esteja sempre divulgando a ciência por meio das feiras e mostras científicas, além de que essa pesquisa traz grandes contribuições para a ciência, mostrando que é possível levar o ensino científico as escolas por meio das exposições científicas.

REFERENCES

ADAMS, F. W. et al. Feira de Ciências: Formando para a Cidadania. Revista Extensão & Cidadania, v. 8, n. 13, p. 85-104, 2020.

BERTOLDO, R. R.; CUNHA, M. B. Feiras de ciências na escola. Atos de Pesquisa em Educação, v. 11, n. 1, p. 293-318, 2016.

BOROCHOVICIUS, E.; TASSONI, ELVIRA C. Aprendizagem baseada em problemas: Uma experiência no ensino fundamental. Educação em Revista, v. 37, 2021.

CASTRO JUNIOR, A. A. et al. A Avaliação da Feira de Ciências de Roraima enquanto espaço de Divulgação Científica. Revista Insignare Scientia-RIS, v. 2, n. 1, p. 75-90, 2019.

COSTA, W. L.; ZOMPERO, A. F.. A iniciação científica no Brasil e sua propagação no Ensino Médio. Revista de Ensino de Ciências e Matemática, v. 8, n. 1, p. 14-25, 2017.

GALLON, M. S. et al. Feiras de Ciências: uma possibilidade à divulgação e comunicação científica no contexto da educação básica. Revista Insignare Scientia, 2019.

GERHARDT, T. E.; SILVEIRA, D. T. Métodos de Pesquisa. Porto Alegre: UFRGS, 2009.

GIL, A. C. Como elaborar projetos de pesquisa. 4. ed. São Paulo: Atlas, 2008.

HILARIO, T. W.; CHAGAS, H. W. K. R. S. O Ensino de Ciências no Ensino Fundamental: dos PCNs à BNCC. Brazilian Journal of Development, v. 6, n. 9, p. 65687-65695, 2020.

LIMA, M. L. O. Feira de Ciências: interdisciplinaridade no Ensino de Biologia para o ensino médio. 2019.

MANCUSO, R.; ROCHA FILHO, I. Programa Nacional de Apoio às Feiras de Ciência da Educação Básica–FENACEB. Secretaria de Educação Básica–Brasília, 2006.

PEREIRA, F.P. O ensino de genética na educação básica: revisão bibliográfica e produção de modelos didáticos. 2019.

RUAS, F.P.; HECKLER, V.; DE ARAUJO, R. R. Motivações e Experiências: o que dizem os professores e licenciandos sobre formações em Feiras de Ciências?. Revista Insignare Scientia-RIS, v. 4, n. 2, p. 110-121, 2021.

SANTOS, K.F. dos et al. Feiras de ciências no ensino médio: atuação dos professores no contexto da prática. 2019.

SANTOS.A, J. M. et al. Análise da Feira de Ciências dos Pequenos Cientistas. Lat. Am. J. Sci. Educ, v. 6, p. 22036, 2019.

SILVA, A. F.; FERREIRA, J.H.; VIERA, C. A. O ensino de Ciências no ensino fundamental e médio: reflexões e perspectivas sobre a educação transformadora. Revista Exitus, v. 7, n. 2, p. 283-304, 2017.

SILVEIRA, A. P.; DA SILVEIRA, D. P.; FREIBERG, J. A. A disciplina de prática enquanto componente curricular IV e as potencialidades de uma feira de ciências. Revista Missioneira, v. 22, n. 1, p. 35-41, 2020.

SOBRE A ORGANIZADORA

ALANA MARIA CERQUEIRA DE OLIVEIRA - Possui graduação em Biomedicina pela Universidade Estadual de Santa Cruz -UESC (2002), licenciada em Biologia pela Faculdade Cruzeiro do Sul (2020), licenciada em Pedagogia pela Faculdade Faveni (2021). Obteve seu Mestrado (2006) e o Doutorado (2011) em Biologia Celular e Molecular pela Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo – FMRP-USP. Pós-Doutorado pelo Instituto Nacional de células Tronco, INCTC -USP (2012). O segundo Pós-doutoramento foi realizado pelo departamento de Clínica Médica Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto- FMRP-USP (2014). Seu terceiro Pós-Doutorado pelo Departamento de Química da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras-FFCL-USP (2016). É docente na Universidade Federal do Acre -UFAC com lotação no Colégio de Aplicação.

Principais temas da pesquisa em

CIÊNCIAS BIOLÓGICAS 3

www.atenaeditora.com.br
contato@atenaeditora.com.br
@atenaeditora
www.facebook.com/atenaeditora.com.br

Atena Editora
Ano 2023

Principais temas da pesquisa em

CIÊNCIAS BIOLÓGICAS 3

www.atenaeditora.com.br
contato@atenaeditora.com.br
@atenaeditora
www.facebook.com/atenaeditora.com.br

Atena Editora
Ano 2023